

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/76551 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05272

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 26 154.7 9. Juni 1999 (09.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE/DE);  
Breisacher Strasse 17, D-79106 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRATZ, Felix  
(DE/DE); Klinik für Tumorbilogie, Breisacher Strasse  
117, D-79106 Freiburg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,  
D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 00/76551 A2

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AN INJECTABLE MEDICAMENT PREPARATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN ARZNEIMITTELZUBEREITUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing injectable medicament preparations containing a therapeutically and/or diagnostically effective substance which is comprised of an active agent, of a spacer molecule and of at least one protein-binding molecule. After being brought into contact with the body, said therapeutically and/or diagnostically effective substance covalently bonds to the body fluid constituents or tissue constituents via the protein-binding molecule, thus providing a form of transport of the active agent that can be hydrolytically or enzymatically cleaved, according to pH, in the body while releasing the active agent.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebestandteile bindet, so dass eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

## Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und  
10 nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile bindet, so daß eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

15

Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Des weiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen  
20 in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential  
25 besitzen, wie etwa Zytostatika, Immunsuppressiva oder Virostatika.

Um die Selektivität von niedermolekularen Pharmaka zu verbessern, werden mehrere Strategien verfolgt, beispielsweise die chemische Derivatisierung von Leitstrukturen, die Formulierung als Prodrugs oder die Kopplung der  
30 Pharmaka an Trägermoleküle. Die vorliegende Erfindung geht von solchen Konzepten aus, bei denen Pharmaka an körpereigene Makromoleküle chemisch gebunden wurden. Bekannt sind Konjugate, bei denen im

- 2 -

allgemeinen Zytostatika an Serumproteine, vorwiegend an bestimmte Trägermoleküle wie Humanserumalbumin und Humanserumtransferrin, gebunden werden und dann verabreicht werden. Diese bekannten Proteinkonjugate werden dadurch hergestellt, daß man ex vivo entweder in einem "Eintopfverfahren" das Zytostatikum an das Serumprotein koppelt (DE 41 22 210 A1) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat gewinnt oder daß man zunächst das Zytostatikum mit einem geeigneten Spacermolekül derivatisiert, das resultierende Produkt isoliert und in einem zweiten Schritt das so derivatisierte Zytostatikum über eine Maleinimidgruppe an das Protein koppelt (DE 196 36 889 A1 und PCT/DE 97/02000) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat isoliert. Beide Verfahren haben den Nachteil, daß Plasmaproteine verwendet werden, die pathogene Erreger enthalten können. Weitere Nachteile der beschriebenen Protein-Wirkstoff-Konjugate sind ihre unbefriedigende Stabilität und Lagerbeständigkeit und der technische Aufwand ihrer Herstellung.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diese Nachteile zu überwinden. Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß als therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff und wenigstens einem proteinbindenden Molekülrest, die durch einen Spacer verbunden sind, verwendet wird, worin der Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar sind. Bei der Spaltung wird der Wirkstoff oder ein Derivat des Wirkstoffes freigesetzt. Unter einem Wirkstoffderivat werden Substanzen verstanden, die den Wirkstoff umfassen, jedoch zusätzlich Teile des Spacers oder der Gruppen, über die der Wirkstoff mit dem proteinbindenden Molekül gebunden war, enthalten können. Die Wirksamkeit des Wirkstoffs sollte durch seine Freisetzung als

- 3 -

Derivat nicht beeinträchtigt werden. Vorzugsweise entfaltet der Wirkstoff bzw. dessen Derivat seine Wirksamkeit erst nach der Freisetzung.

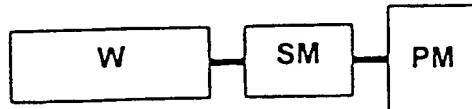
Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß es nicht, wie  
5 bisher angenommen wurde, nötig ist, einen Wirkstoff mit einem bestimmten  
Träger unter definierten Bedingungen zu verbinden und das Produkt zu  
verabreichen, sondern daß es möglich ist, therapeutisch und/oder  
diagnostisch wirksame Substanzen, bestehend aus einem  
pharmakologischen Wirkstoff, und wenigstens einem proteinbindenden  
10 Molekülteil, die durch einen Spacer miteinander verbunden sind, direkt als  
injizierbare Arzneimittel einzusetzen, da diese nach dem Zusammenbringen  
mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent derart an  
Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile, vorwiegend an Serumproteine,  
binden, daß in vivo eine Transportform des Wirkstoffs gebildet wird, welche  
15 die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Wirkstoffs erreicht. Da  
erfindungsgemäß bei der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen  
Substanz die Bindung im Spacermolekül oder zwischen dem Wirkstoff und  
dem Spacermolekül pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper  
spaltbar ist, wird der Wirkstoff trotzdem gezielt am gewünschten Zielort  
20 freigesetzt.

Erfindungsgemäß erhaltene injizierbare Arzneimittelzubereitungen von  
therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen verändern und  
verbessern aufgrund ihrer proteinbindenden Eigenschaften das  
25 pharmakokinetische Profil der Wirkstoffe entscheidend. Wenn diese  
therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen in  
Körperflüssigkeiten gelangen, binden sie kovalent an Körperflüssigkeits-  
oder Gewebebestandteile, vorzugsweise an Serumproteine, mehr bevorzugt  
an Serumalbumin, um so als makromolekulare Prodrugs vorzuliegen, die den  
30 Wirkstoff zu dem Zielort transportieren und/oder ihn in einer dosierten Form  
freisetzen.

- 4 -

Die erfindungsgemäß erhaltene therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz besteht aus einem Wirkstoff W, einem Spacermolekül SM und wenigstens einem proteinbindenden Molekül PM mit folgender allgemeiner Struktur:

5



Zusätzlich kann die erfindungsgemäß erhaltene Substanz Markierungsgruppen bzw. markierte Elemente oder Moleküle aufweisen, wobei sich die Substanz dann insbesondere für diagnostische Zwecke eignet. Bevorzugte Marker sind ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, eine oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

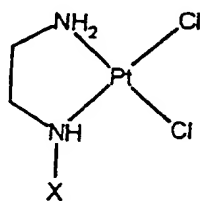
Ein Diagnostikum im Sinne dieser Erfindung ist beispielsweise ein wie oben beschrieben markierter Wirkstoff oder ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

Der Wirkstoff ist ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein Analgetikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Antimykotikum, ein Signaltransduktionsinhibitor, ein Angiogeneseinhibitor oder ein Proteaseinhibitor.

Bevorzugte Zytostatika für die Herstellung von injizierbaren therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine

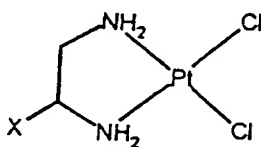
sowie verwandte Derivate, die Antimetabolite Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophyllotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitopodozid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate, die Calicheamicine, die Maytansinoide und eine Verbindung der allgemeinen Formel I bis XII:

10

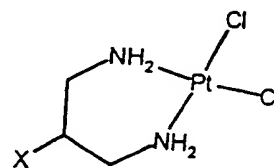


15

Formel I

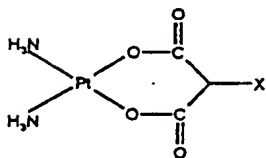


Formel II



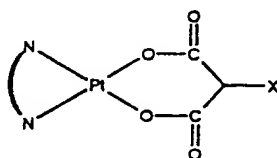
Formel III

Formel IV

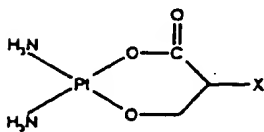


20

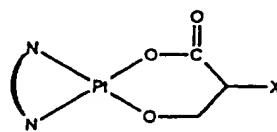
Formel V



Formel VI

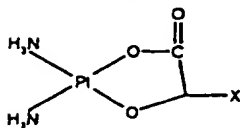


Formel VII

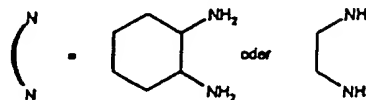
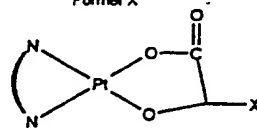


25

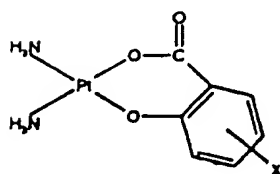
Formel IX



Formel X

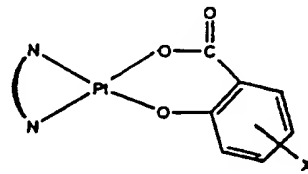


Formel XI



30

Formel XII



- 6 -

wobei X das Spacermolekül SM oder das proteinbindende Molekül PM bedeutet.

5 Bevorzugte Zytokine für die Herstellung von therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen der vorliegenden Erfindung sind Interleukin 2, Interferon  $\alpha$ -2a, Interferon  $\alpha$ -2b, Interferon  $\beta$ -1a, Interferon  $\beta$ -1b, Interferon  $\gamma$ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

10 Bevorzugte Immunsuppressiva für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Cyclosporin A und verwandte Derivate, sowie Tacrolimus (FK 506) und verwandte Derivate.

15 Besonders geeignete Antirheumatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Methotrexat und verwandte Derivate.

20 Bevorzugte Analgetika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder Ibuprofen bzw. Naproxen, und Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

25 Bevorzugte Antimykotika für Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Amphotericin B und verwandte Derivate.

30 Bevorzugte Virostatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Nukleosidanaloga, wie etwa Aciclovir, Ganciclovir, Idoxuridin, Ribavirin, Vidaribin, Zidovudin, Didanosin und 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) und verwandte Derivate, und Amantadin.

Bevorzugte Antibiotika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Sulfonamide, wie etwa Sulanilamid, Sulfacarbamid und Sulfametoxydiazin

- 7 -

- und verwandte Derivate, Penicilline, wie etwa 6-Aminopenicillansäure, Penicillin G sowie Penicillin V und verwandte Derivate, Isoxazolpenicilline (z.B. Oxacillin, Cloxacillin, Flucloxacillin) und verwandte Derivate,  $\alpha$ -substituierte Benzylpenicilline (z.B. Ampicillin, Carbenicillin, Pivampicillin, Amoxicillin) und verwandte Derivate, Acylaminopenicilline (z.B. Mezlocillin, Azlocillin, Piperacillin, Apalocillin) und verwandte Derivate, Amidinopenicilline, wie etwa Mecillinam, atypische  $\beta$ -Lactame, wie etwa Imipenam und Aztreonam, Cephalosporine, wie etwa Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefixim, Cefpodoxim, Cefazolin, Cefazedon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefotiam, Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol, Latamoxef, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefmonoxim, Ceftazidim, Cefsulodin und Cefoperazon und verwandte Derivate, Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Demeclocyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin und verwandte Derivate, Chloramphenicole, wie etwa Chloramphenicol und Thiamphenicol und verwandte Derivate, Gyrasehemmerstoffe, wie etwa Nalidixinsäure, Pipemidsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin und verwandte Derivate, und Tuberkulosemittel, wie etwa Isoniazid und verwandte Derivate.
- Das Spacermolekül SM ist ein organisches Molekül bestehend aus einer aliphatischen Kohlenstoffkette und/oder einem aliphatischen Kohlenstoffring und/oder mindestens einem Aromaten. Die/der aliphatische Kohlenstoffkette/-ring besteht vorzugsweise aus 1-12 Kohlenstoffatomen, die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, und kann gegebenenfalls substituiert sein, insbesondere durch eine oder mehrere wasserlösliche Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen. Der Aromat ist vorzugsweise ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann, wie etwa mit den obengenannten wasserlöslichen Gruppen. Die aliphatische Kohlenstoffkette kann zur besseren Wasserlöslichkeit Sauerstoffatome enthalten und sich dazu zweckmäßig von einer Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidkette ableiten, z.B. eine Diethylenglycol-, Triethylenglycol- oder Dipropylenglycolkette sein.



Das proteinbindende Molekül PM ist vorzugsweise eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-Hydroxysuccinimidester- oder eine Isothiocyanat-Gruppe. Es kann auch eine Disulfidgruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe oder eine Acetylengruppe sein. Die Disulfidgruppe ist bevorzugt aktiviert, in der Regel dadurch, daß eine Thionitrobenzoesäure (z.B. 5'-Thio-2-Nitrobenzoesäure) die austauschbare Gruppe darstellt. Die Gruppen können gegebenenfalls substituiert sein. Die Maleinimid-, Pyridyldithio- bzw. N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe kann gegebenenfalls mit Alkyl oder mit den obengenannten wasserlöslichen Gruppen substituiert sein. PM besitzt proteinbindende Eigenschaften, d.h. es bindet im physiologischen Milieu kovalent an bestimmte Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Dabei reagiert die Maleinimid-, die Halogenacetamid-, die Halogenacetat-, die Pyridyldithio-Gruppe, die Disulfidgruppe, die Vinylcarbonylgruppe, die Aziridingruppe bzw. die Acetylengruppe vorzugsweise mit HS-Gruppen von Cysteinen, die N-Hydroxysuccinimidester- und Isothiocyanatgruppe reagiert vorzugsweise mit der Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche.

Die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung als injizierbare Arzneimittelzubereitung bereitgestellte therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz gelangt nach parenteraler Applikation in die Blutbahn und kann über PM an Proteine binden. Bevorzugt erfolgt die Bindung an Serumproteine, insbesondere Serumalbumin. Es wurde gefunden, daß im physiologischen Milieu die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz über die Maleinimid-, Halogenacetamid-, Halogenacetat-, Pyridyldithio-Gruppe, die Disulfidgruppe, die Vinylcarbonylgruppe, die Aziridingruppe bzw. die Acetylengruppe insbesondere mit dem freien Cystein-34 des Albumins reagiert und auf diesem Weg kovalent gebunden wird. Pharmakologisch aktive Substanzen mit einer N-Hydroxysuccinimidester- bzw. Isothiocyanat-Gruppe binden bevorzugt an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche von Albumin oder

- 9 -

anderen Serumproteinen. Serumproteine, wie Albumin oder Transferrin, weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tagen - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. Adv. Protein. Chem. 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von  
5 Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für Makromoleküle gelangt Serumalbumin bevorzugt in dieses Zielgewebe (Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an Albumin gekoppelter Wirkstoff gezielter den Wirkort erreichen. Des weiteren verhindert die kovalente Kopplung des  
10 Wirkstoffs an Serumproteine in der Blutbahn, daß der Wirkstoff in gesunde Gewebestrukturen des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie der nicht gebundene Wirkstoff. Dadurch wird das pharmakokinetische Profil des Wirkstoffs verändert und verbessert, da seine Wirkung durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht  
15 wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen enthalten im Spacermolekül oder  
20 zwischen SM und W eine definierte chemische Bindung. Diese Bindung ist pH-abhängig, vorzugsweise säurelabil, spaltbar bzw. hydrolytisch spaltbar, oder sie enthält mindestens eine Bindung, die im Körper enzymatisch gespalten wird, vorzugsweise eine Peptidbindung.

25 Bindungen, die durch Hydrolyse unter Freisetzung des Wirkstoffs gespalten werden, sind beispielsweise Esterbindungen oder Metallkomplexbindungen, wie sie bei Platin-Dicarboxylat-Komplexen vorliegen, wobei ein Diammindiaquo-Platin(II)-Komplex freigesetzt wird. Die säurelabilen spaltbaren Bindungen sind Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon,  
30 Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindungen oder cis-Aconitylbindungen oder eine Tritylgruppe enthaltende Bindungen, wobei die Tritylgruppe substituiert oder nicht substituiert sein kann. Bevorzugte

- 10 -

therapeutisch/diagnostisch relevante säurelabile Bindungen sind beispielsweise in Kratz et al. (1990) Crit. Rev. Ther. Drug. Car.Sys. 16 (3), 245-288 beschrieben. Die Peptidsequenz in den realisierten Peptidbindungen besteht in der Regel aus etwa 2-30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter Enzyme, nachstehend als Targetenzyme bezeichnet, im Körper zugeschnitten, so daß die Peptidsequenz oder ein Teil diese Sequenz von einem Enzym im Körper erkannt wird und das Peptid gespalten wird. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht die enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Bindung, die keine Peptidbindung ist. Beispiele sind Carbamatbindungen, die durch krankheitsspezifische Enzyme, z.B. Glutathion-S-Transferasen, Glucuronidasen, Galactosidasen, den Wirkstoff oder ein Wirkstoffderivat freisetzen. Es ist auch ohne weiteres möglich, daß eine enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Peptidsequenz und einer der obengenannten Bindungen, die keine Peptidbindung ist, aufgebaut ist. Die Targetenzyme können sowohl körpereigene Enzyme sein oder Enzyme, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden.

Die Targetenzyme sind in der Regel Proteasen, Serinproteasen, Plasminogenaktivatoren und Peptidasen, beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMP) oder Cysteinproteasen, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2, MMP3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B, H und L, die als

- 11 -

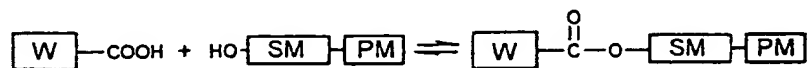
Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind.

Die oben genannten Bindungstypen gewährleisten, daß der Wirkstoff oder  
5 ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär nach Aufnahme des Konjugats durch die Zelle freigesetzt wird und seine therapeutische und/oder diagnostische Wirkung entfalten kann.

Die Spaltung kann auch dergestalt ablaufen, dass nicht der Wirkstoff als  
10 solcher abgespalten wird, sondern ein Derivat des Wirkstoffs. Ein solches Derivat enthält somit den Wirkstoff sowie daran gebundene Gruppen, die aus dem Spacermolekül stammen, je nachdem, an welcher Stelle die gewünschte Spaltung erfolgt ist.

15 Die im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz kann gemäß einer der untenstehenden allgemeinen Beschreibungen hergestellt werden:

Wirkstoffe, die eine HOOC-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen  
20 derivatisiert:

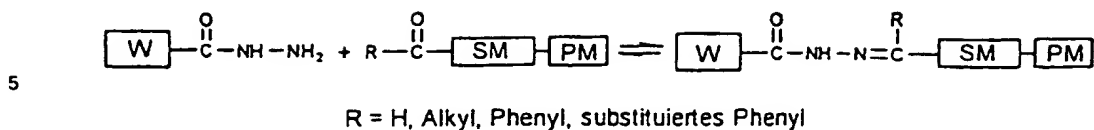


Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann  
25 geläufig sind.

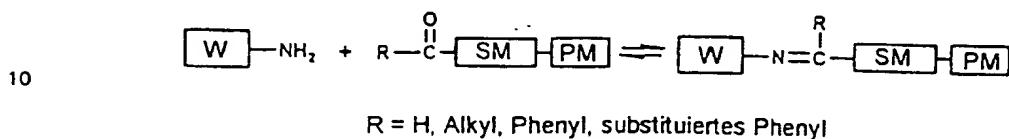
Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu  
überführen, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und  
anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE 196 36 889), und  
30 das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einem eine Carbonylkomponente enthaltenden Spacer, bestehend aus PM und SM,

- 12 -

umzusetzen, wie u.a. in DE 196 36 889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben ist:

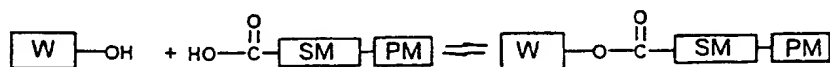


Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine H<sub>2</sub>N-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



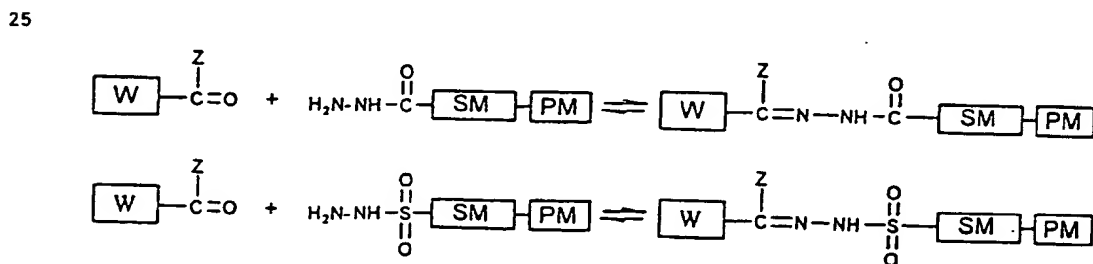
Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

15 Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine HO-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:

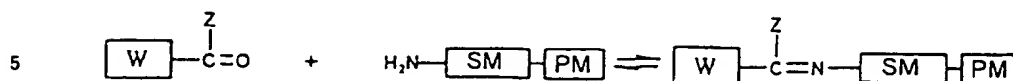
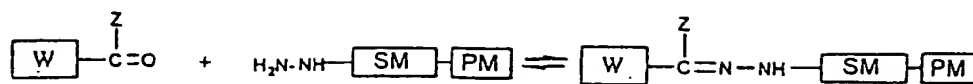


20 Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine Carbonylkomponente besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



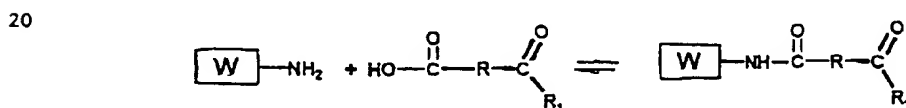
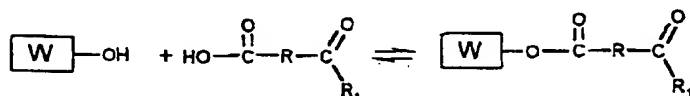
- 13 -



Z = chemische Gruppe des Wirkstoffs

Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36  
 10 889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben sind, oder durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Es ist weiterhin möglich, eine HO-Gruppe oder eine NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Wirkstoffs in eine Carbonylkomponente zu überführen, z.B. durch  
 15 Veresterung bzw. Amidbildung mit einer Carbonsäure-tragenden Carbonylkomponente gemäß folgender allgemeiner Formel:



wobei R eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder ein aliphatischer Kohlenstoffring und/oder ein Aromat und R<sub>1</sub> = H, Alkyl-, Phenyl- oder eine  
 25 substituierte Phenylgruppe ist. R besteht in der Regel aus 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls substituiert sein können, z.B. durch wasserlösliche Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen. Der Aromat ist in der Regel ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann, wie etwa mit den oben genannten  
 30 wasserlöslichen Gruppen.

- 14 -

Die Carbonylkomponente kann des Weiteren durch andere chemische Reaktionen eingeführt werden, so z.B. durch eine elektrophile Substitution an der HO- oder NH<sub>2</sub>-Gruppe des Wirkstoffs mit einer geeigneten Carbonylkomponente.

5

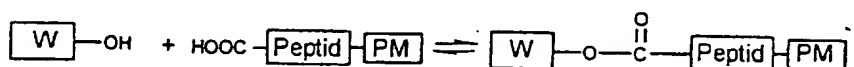
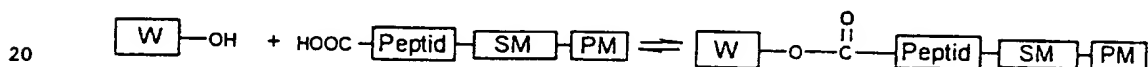
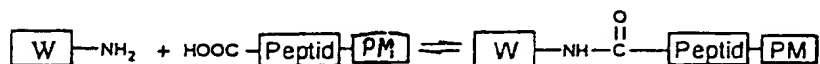
Die so derivatisierten Wirkstoffe, die nun eine Carbonylkomponente besitzen, werden analog zu den oben beschriebenen Verfahren mit den proteinbindenden Spacermolekülen, die eine Amino-, Hydrazid- oder Hydrazingruppe besitzen, zu den entsprechenden Carboxylhydrazon-,  
10 Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten umgesetzt. Die säurelabile Spaltung dieser Bindungen führt demnach zu einer Freisetzung des derivatisierten Wirkstoffs, der eine Carbonylkomponente besitzt.

Die Spacer, die aus dem proteinbindenden Molekül PM und dem  
15 Spacermolekül SM bestehen, können z.B. gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36 889 A1, U. Beyer et al. Chemical Monthly, 128, 91, 1997, R.S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600, 1990, T. Kaneko et al., *Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991, Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996 oder in US-Patent 4,251,445  
20 beschrieben sind, hergestellt werden.

Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen für die vorliegende Erfindung, die eine Peptidbindung enthalten, können dadurch hergestellt werden, daß ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren  
25 besteht, mit einer proteinbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß ein proteinbindendes Molekül direkt oder über ein Spacermolekül SM am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird. Die Synthese von solchen proteinbindenden Peptidderivaten erfolgt vorzugsweise durch eine dem Fachmann geläufige Festphasensynthese, wobei im letzten Schritt des  
30 Peptidaufbaus ein Carbonsäure tragendes proteinbindendes Spacermolekül, z.B. eine Maleinimidocarbonsäure, durch Peptidkopplung an das N-terminal ende des Peptids gebunden und das proteinbindende Peptid im Anschluss

- 15 -

von der Festphase abgespalten wird. Die so erhaltenen Peptidderivate können mit einem Wirkstoff, der eine H<sub>2</sub>N- oder HO-Gruppe besitzt, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat (CMC), (Benzotriazol-1-yloxy)-triscyclohexylphosphoniumhexafluorophosphat (pyBOP) oder O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-Hydroxysuccinimids, wie etwa N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz oder 1-Hydroxybenzotriazol und/oder in Gegenwart einer Base, wie z.B. N-Methylmorpholin oder Triethylamin, zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umgesetzt werden:



25

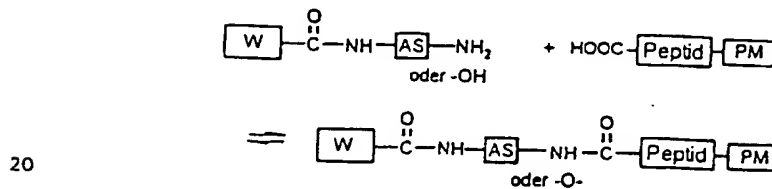
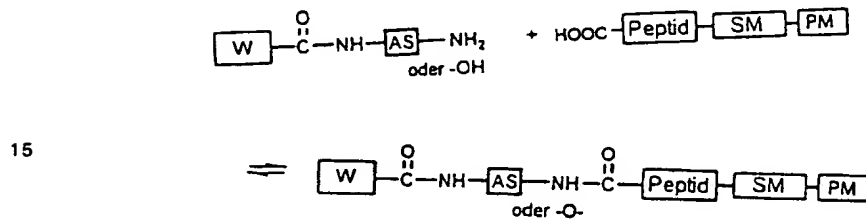
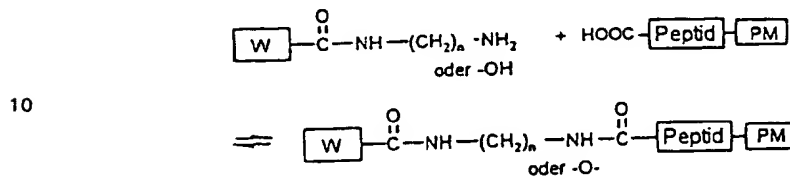
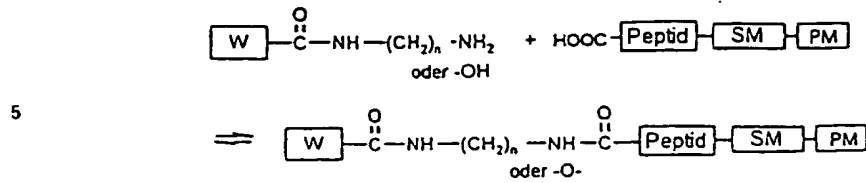
Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Wirkstoffe eine H<sub>2</sub>N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch Derivatisierung mit den Aminosäuren (AS) Lysin, Serin oder Threonin über deren  $\alpha$ -Aminogruppe oder über die  $\alpha$ -Aminogruppe mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> oder mit einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH mit n = 1-12, und diese Derivate im Anschluß mit

30



- 16 -

den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umzusetzen:



AS = Lysin, Serin oder Threonin

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP3, MMP 9, Cathepsin B, H und L, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

Beispielsweise sind Octapeptide ( $P_4 - P'_4$ ) für MMP 2 und MMP 9 identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren, und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden:

- 17 -

## Peptid

$$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \quad P'_1 \quad P'_2 \quad P'_3 \quad P'_4$$

Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln

5 Gly-Pro-Gln-Gly—Ile-Trp-Gly-Gln

(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, 6427-6432).

10 Die Peptide werden ausschließlich an der  $P_1$  -  $P'_1$ -Bindung enzymatisch gespalten.

Desweiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Dipeptide bekannt mit der Sequenz -Arg-Arg-, -Phe-Lys-, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu oder Ala-Leu-Ala-Leu (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

20 Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

-Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln

oder

25 -Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

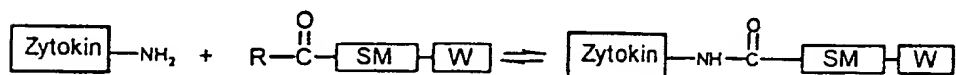
oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen dem proteinbindenden Molekül und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

30 -Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Lys-Phe-Lys-

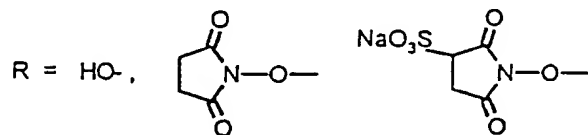
- 18 -

Entscheidend für die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid vorkommt. Die oben aufgeführten  
 5 Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die Herstellung von therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanzen.

Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanzen für die vorliegende Erfindung, die ein Zytokin enthalten, können dadurch hergestellt  
 10 werden, daß das Zytokin mit einem eine proteinbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:



15



Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz)  
 20 auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins mit einem eine proteinbindenden Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-  
 25 toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz, zu den entsprechenden proteinbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt zweckmäßig mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind dem  
 30 Fachmann geläufig (Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

- 19 -

Im Anschluß an die Synthese der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz wird eine injizierbare Arzneimittelzubereitung, enthaltend die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, in einer geeigneten Trägerflüssigkeit hergestellt. Die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, wobei vor oder nach dem Lyophilisieren übliche Träger und/oder pharmazeutische Hilfsstoffe, wie etwa Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure beigefügt sein können. Die injizierbare Arzneimittelzubereitung muß so hergestellt werden, daß das proteinbindende Molekül durch das Lösen in der injizierbaren Trägerflüssigkeit nicht deaktiviert, abgespalten oder hydrolysiert wird. Weiterhin muß gewährleistet werden, daß die säurelabile Bindung in der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz, die eine Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindung ist, nicht hydrolysiert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten proteinbindenden Moleküle sind basenempfindlich, so daß der pH-Wert der Trägerflüssigkeit einen pH-Wert von 8,0 nicht überschreiten soll. Bevorzugt liegt der pH-Wert im Bereich von pH 4,0-7,0, mehr bevorzugt zwischen pH 6,0 und pH 7,0. Außerdem muß die Trägerflüssigkeit natürlich physiologisch verträglich sein.

Bevorzugte Trägerflüssigkeiten sind annähernd isotonische Salzpuffer, z.B. Phosphat-, Acetat- oder Citratpuffer, wie etwa, 0.004 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl - pH 6,0-7,0 oder 0.01 M Natriumacetat, 0.14 M NaCl - pH 5,0-6,5). Die verwendete Trägerflüssigkeit kann auch eine isotonische Natriumchloridlösung sein. Die Salzpuffer können übliche Träger und/oder Hilfsstoffe, wie etwa Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure enthalten.

30

Die Löslichkeit der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz in der injizierbaren Trägerflüssigkeit kann durch pharmazeutische

- 20 -

Lösungsmittel, wie etwa Ethanol, Isopropanol, 1,2-Propylenglykol, Glycerol, Macrogole, Polyethylenglykole bzw. Polyethylenoxide oder durch Lösungsvermittler, z.B. Tween, Cremophor oder Polyvinylpyrrolidon, verbessert werden. Zu diesem Zweck wird die therapeutisch und/oder  
5 diagnostisch wirksame Substanz entweder in dem pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler gelöst und anschließend mit einem Salzpuffer verdünnt oder eine Trägerflüssigkeit, enthaltend den Salzpuffer und mindestens ein pharmazeutisches Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler, wird zum Lösen der therapeutisch und/oder diagnostisch  
10 wirksamen Substanz direkt verwendet. Die Konzentration der pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler überschreiten dabei nicht die Mengen, die vom Arzneimittelgesetz (AMG) vorgeschrieben sind.

15 Vorzugsweise sollte die Trägerflüssigkeit so ausgewählt werden, daß der Lösevorgang der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz in der Trägerflüssigkeit nach wenigen Minuten abgeschlossen ist, so daß eine injizierbare Arzneimittelzubereitung am Krankenbett zur Verfügung gestellt wird.

20

Es kann auch zusätzlich ein Trägermolekül, wie etwa eines der eingangs genannten, mit der wirksamen Substanz in Kontakt gebracht werden, wobei die wirksame Substanz in der Lage ist, an dieses Trägermolekül zu binden. Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung  
25 somit den Schritt des Zusammenbringens des Trägermoleküls und der proteinbindenden therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz ex vivo und anschließender parenteraler Applikation. Auf diesem Weg kann - falls erwünscht bzw. notwendig - die Selektivität der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz für ein Trägermolekül, beispielsweise für Albumin, verbessert werden. Die Trägermoleküle sind  
30 bevorzugt ausgewählt aus den genannten, insbesondere Serumproteinen.

- 21 -

Die therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, eignet sich somit zur Behandlung von Krebskrankheiten, Viruskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und/oder Erkrankungen, die durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen verursacht werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Wirkstoff, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest aufweist, welcher mit dem Wirkstoff durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Wirkstoff pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Wirkstoffs, wobei der Wirkstoff kein Zytostatikum ist.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Diagnostikum, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest, welcher mit dem Diagnostikum durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Diagnostikum pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Diagnostikums. Wie oben erwähnt, umfaßt das Diagnostikum bevorzugt ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, enthaltend eine erfindungsgemäße proteinbindende diagnostisch wirksame Substanz, gegebenenfalls zusammen mit dem

- 22 -

Trägermolekül und pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffen, Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln, insbesondere ausgewählt aus den oben genannten. Der erfindungsgemäße diagnostische Kit kann bevorzugt zum Nachweis der wie oben definierten Erkrankungen oder zum Nachweis von

5 Trägermolekülen und/oder deren Verteilung im Organismus verwendet werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine

10 diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass als diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung umfassend ein Diagnostikum und wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest verwendet wird. Ein Diagnostikum kann eine der oben genannten Verbindungen sein,

15 beispielsweise ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrer Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, ein oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich. Das Diagnostikum und der wenigstens eine proteinbindende Molekülrest können

20 auch durch einen Spacer verbunden sein. Hierbei ist es bevorzugt, dass der Spacer oder die Bindung, welche die beiden Komponenten verbindet, nicht spaltbar ist. Beispiele für nicht im Körper spaltbare Bindungen, die bei der Bindung zur diagnostisch wirksamen Substanz vorliegen können, sind Amidbindungen, gesättigte bzw. ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-

25 Bindungen oder Bindungen zwischen Kohlenstoff und einem Heteroatom, -C-X-, wobei X vorzugsweise O, N, S oder P ist. Eine bevorzugte Bindung ist eine Amidbindung. Die Freisetzung der therapeutisch wirksamen Substanz ist bevorzugt, da in der Regel der niedermolekulare Wirkstoff mit seinem molekularen Target wechselwirken muß, um seine pharmakologische

30 Wirksamkeit zu entfalten. Bei diagnostisch wirksamen Substanzen hingegen ist eine Freisetzung des Protein gebundenen Diagnostikums nicht unbedingt erforderlich, kann aber vorhanden sein. Erfindungsgemäß kann deshalb die

- 23 -

diagnostisch wirksame Substanz zusätzlich über eine nicht im Körper spaltbare Bindung an das Spacermolekül oder direkt an die proteinbindende Gruppe ohne Vorhandensein eines Spacermoleküls SM gebunden sein.

5 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

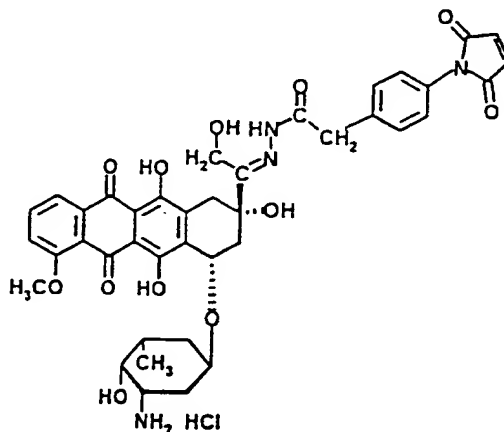
### Beispiel 1

#### Herstellung von DOXO-HYD

Die im folgenden abgebildete pharmakologisch aktive Substanz (abgekürzt  
10 DOXO-HYD) besteht aus dem Zytostatikum Doxorubicin, aus einer Maleinimidgruppe als proteinbindendes Molekül PM und aus einem Phenylacetylhydrazonspacer als Spacermolekül SM. Die Bindung zwischen Doxorubicin und dem Spacermolekül SM ist eine säurelabile Carboxylhydrazonbindung:

15

20



25

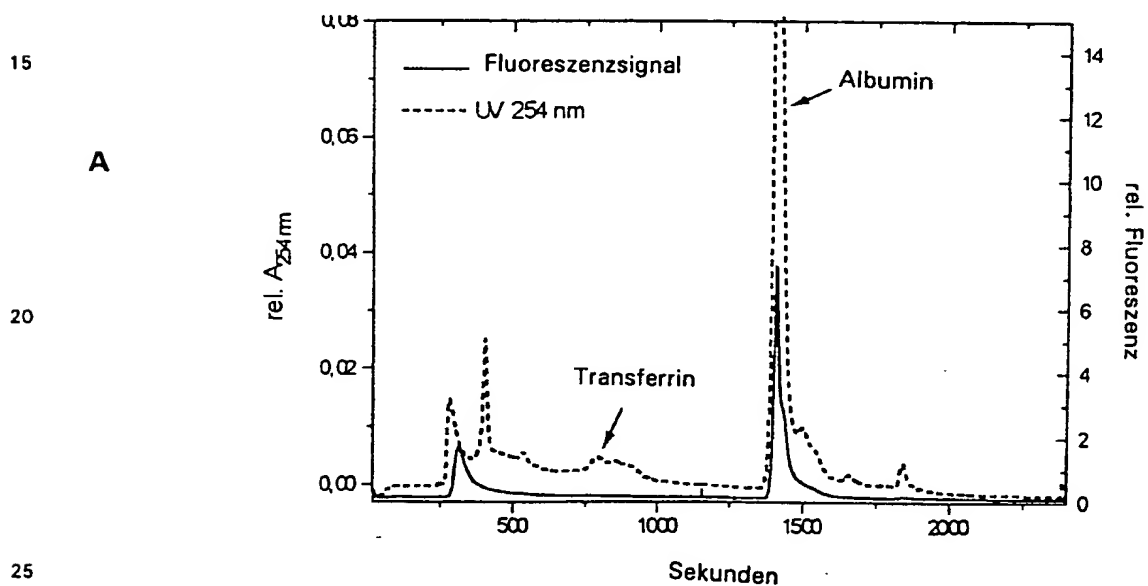
10,51 mg DOXO-HYD werden in 2,0 ml 1,2-Propylenglykol durch Schütteln  
gelöst und anschließend wird diese Lösung mit 8,0 ml Phosphatpuffer  
(0.004 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl - pH 6,5) verdünnt und  
homogenisiert (Konzentration von DOXO-HYD in der Trägerflüssigkeit  $\approx$   
1300  $\mu$ M). Die so hergestellte injizierbare Arzneimittelzubereitung von  
DOXO-HYD wurde Versuchstieren unmittelbar intravenös verabreicht (siehe  
30 unten).



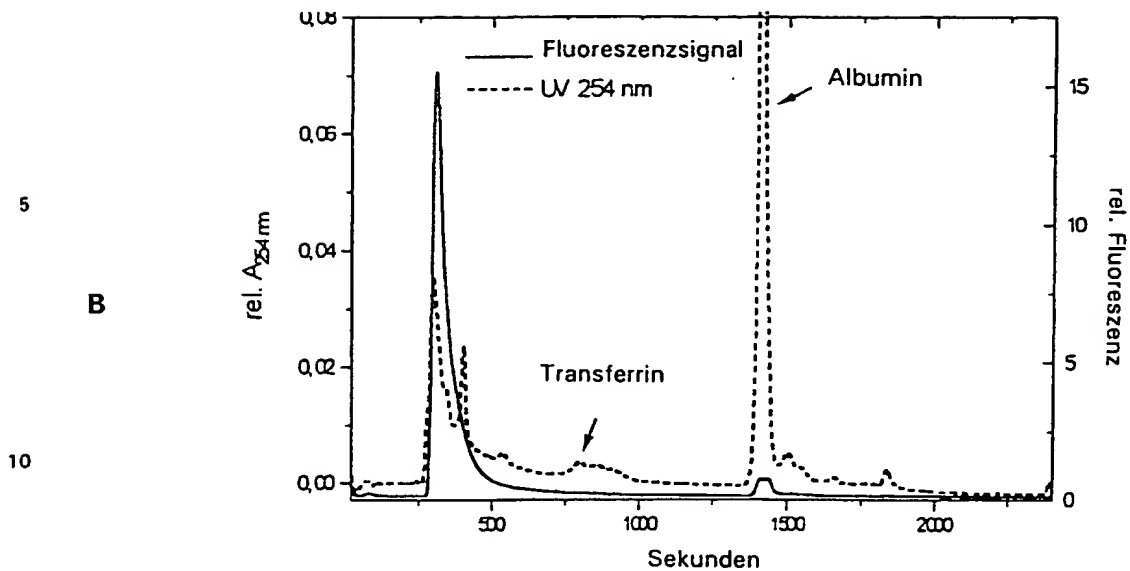
**Beispiel 2****Bindung von DOXO-HYD an Humanplasma**

Nachdem DOXO-HYD in die Blutbahn gelangt, findet eine Bindung an Serumproteine statt, vorzugsweise an Serumalbumin, so daß DOXO-HYD u.a. als säurelabiles Albumin-Doxorubicin-Konjugat vorliegt.

Inkubationsstudien von Humanblutplasma mit DOXO-HYD bei 37 °C zeigen, daß nach einer 5-minütigen Inkubation der Großteil von DOX-HYD kovalent an Albumin gebunden ist. (A) - im Gegensatz zu freiem Doxorubicin (B). Dieser Sachverhalt ist in den untenstehenden Chromatogrammen dargestellt. (A und B):



- 25 -



Hierbei wurde nach erfolgter Inkubation die Plasmaprobe über eine POROS®-20-Anionenaustauschersäule getrennt (Detektion der Proteine bei 254 nm, Detektion des Anthrazyklins durch Fluoreszenz).

### Beispiel 3

#### Die Wirksamkeit von DOXO-HYD in vivo

Die unten aufgeführten biologischen Daten verdeutlichen die in vivo Wirksamkeit von DOXO-HYD im Vergleich zu freiem Doxorubicin: Im sogenannten RENCA (renal cell carcinoma)-Modell wurde Doxorubicin und DOXO-HYD hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei annähernd äquitoxischer Dosis miteinander verglichen (intravenöse Therapie 10 Tage nach Injektion von etwa 1 Million Nierenkarzinomzellen in der linken Niere).

- 26 -

Tiere: Balb/c-Mäuse, weiblich; Tumor: RENCA, renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)

Therapie: Tag(d) 10, 13, 17 und 20 intravenöse (i.v.), Ende des Versuchs

5 d24

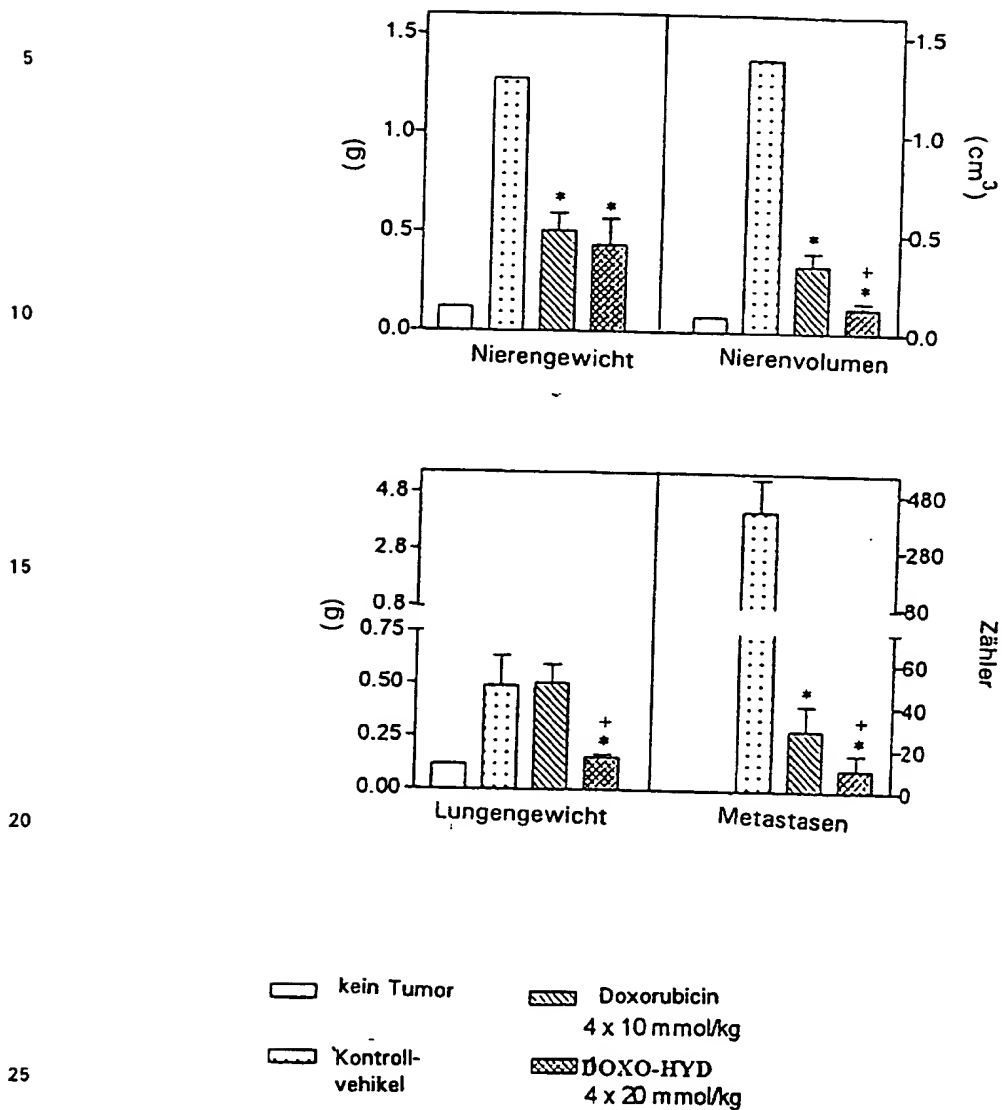
10

Anzahl der Mäuse	Substanz	Dosis	Durchschnittliche Körpergewichtsabnahme (%) d 1-24
10	Kontrolle		
10	Doxorubicin	4 x 10 mmol/kg	-15
10	DOXO-HYD	4 x 20 mmol/kg	-15

15 Die Ergebnisse dieses Versuches sind untenstehend abgebildet. DOXO-HYD zeigt eine sehr gute antitumorale Wirksamkeit und erzielt eine deutliche Reduktion des Nierentumorumfanges und der Anzahl von Lungenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Doxorubicin behandelten Gruppe.

- 27 -

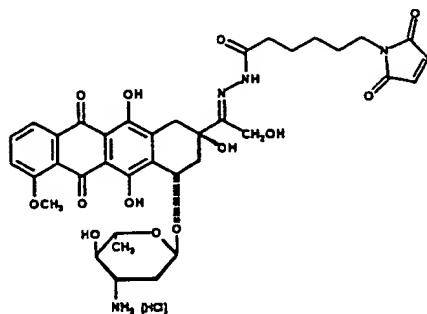
# Gewicht und Volumen der Nieren und Nierentumoren sowie Anzahl der Lungenmetastasen



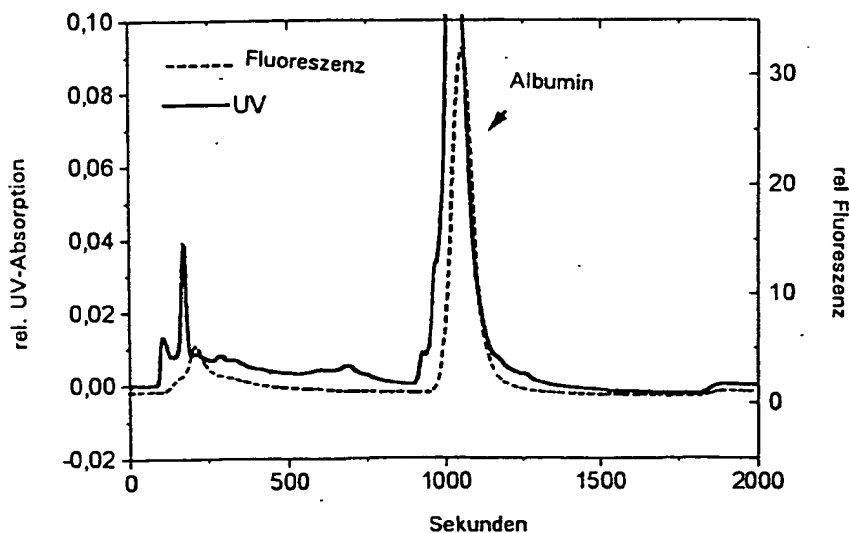
**Beispiel 4****Bindung von DOXO-EMHC an Albumin im Humanplasma**

1,6 mg des 6-Maleinimidocapronehydrazon-Derivats von Doxorubicin

(abgekürzt DOXO-EMHC) mit untenstehender Strukturformel



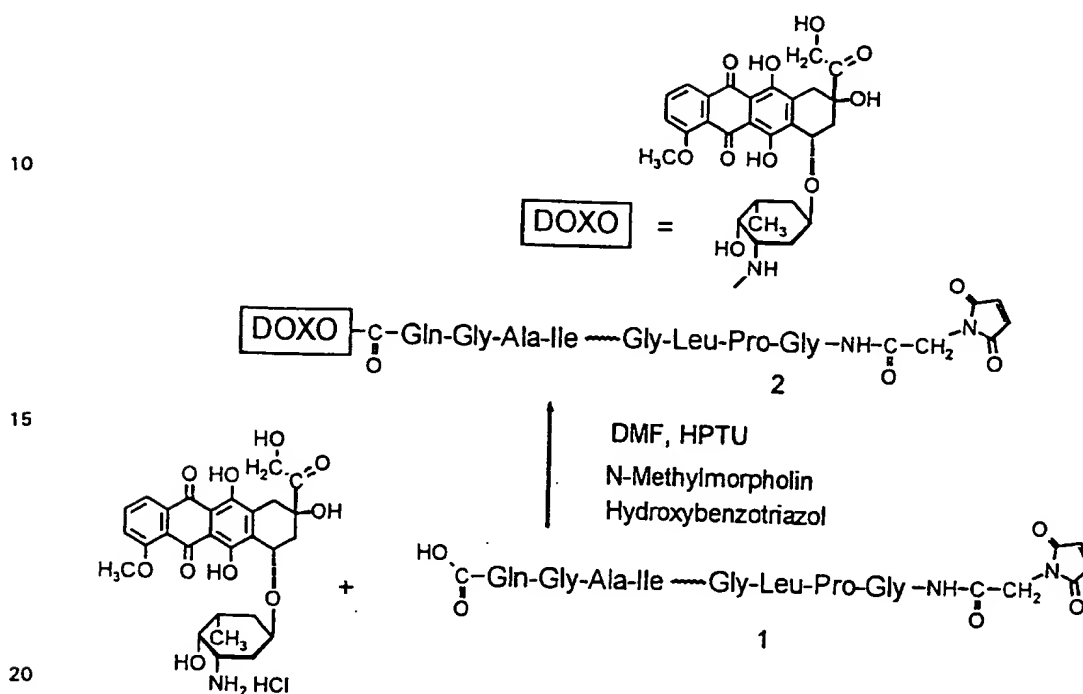
werden in 1,0 ml Phosphatpuffer (0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 6,5) bei Raumtemperatur gelöst (2000  $\mu$ M Lösung). Werden 250  $\mu$ l dieser Lösung mit 1,0 ml Humanplasma 30 Sekunden lang bei 37 °C inkubiert, und die Probe anschließend über einen schwachen Anionenaustauscher (von POROS®) getrennt, zeigt sich, daß der überwiegende Teil von DOXO-EMHC an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):



**Beispiel 5**

Bindung eines durch MMP9 spaltbares Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivats (2) an Albumin nach einminütiger Inkubation mit Humanplasma

Das Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat (2) wurde gemäß folgender Reaktionsgleichung hergestellt:



Dabei wird das mit Maleinimidoglycin derivatisierte Octapeptid Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (Mr 848, hergestellt durch Festphasensynthese durch Bachem AG, Schweiz) mit Doxorubicin laut folgender Vorschrift umgesetzt:

25

Zu einer leicht trüben Lösung von 17,1 mg Doxorubicin in 3 ml DMF werden 25 mg 1 (als Trifluoracetatsalz) gelöst in 500  $\mu$ l DMF, 33,5 mg O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HPTU) gelöst in 200  $\mu$ l DMF, 11,9 mg Hydroxybenzotriazolhydrat gelöst in 100  $\mu$ l DMF und 16,2  $\mu$ l N-Methylmorpholin zugegeben, und der Ansatz anschließend 18 h lang bei RT im Dunklen gerührt. DMF wurde am Hochvakuum entfernt und der Feststoff in 20 ml Methanol aufgenommen, filtriert und im Vakuum auf

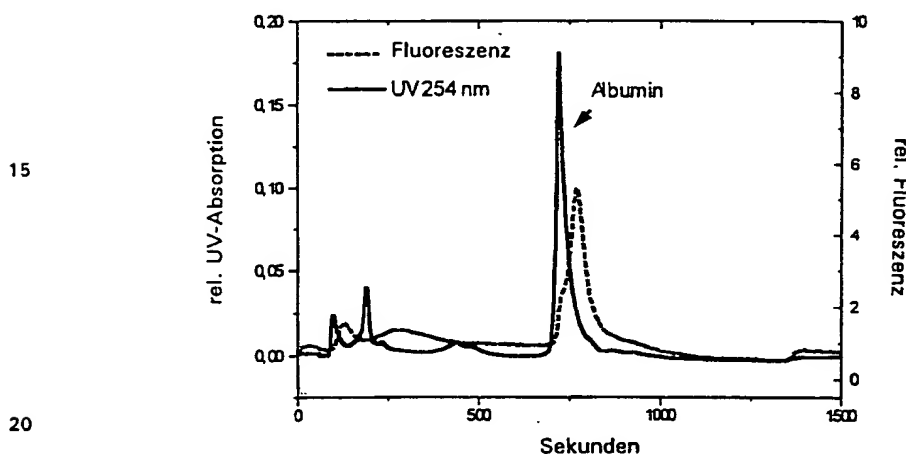
30

- 30 -

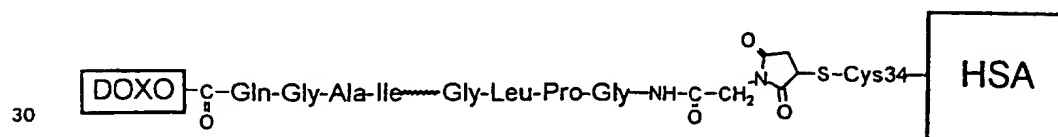
1 ml eingengt. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester/Methanol 2/1) wurden 5 mg 2 erhalten.

### Inkubationsstudie mit Humanplasma

- 5 1,4 mg 2 (Mr 1374) werden in 1,0 ml Phosphatpuffer (0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 6,5) bei Raumtemperatur gelöst (1000  $\mu$ M Lösung). Werden 300  $\mu$ l dieser Lösung mit 1,0 ml Humanplasma 60 Sekunden lang bei 37 °C inkubiert, und die Probe anschließend über einen schwachen Anionenaustauscher (von POROS®) getrennt, zeigt sich, daß der  
10 überwiegende Teil von 2 an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):

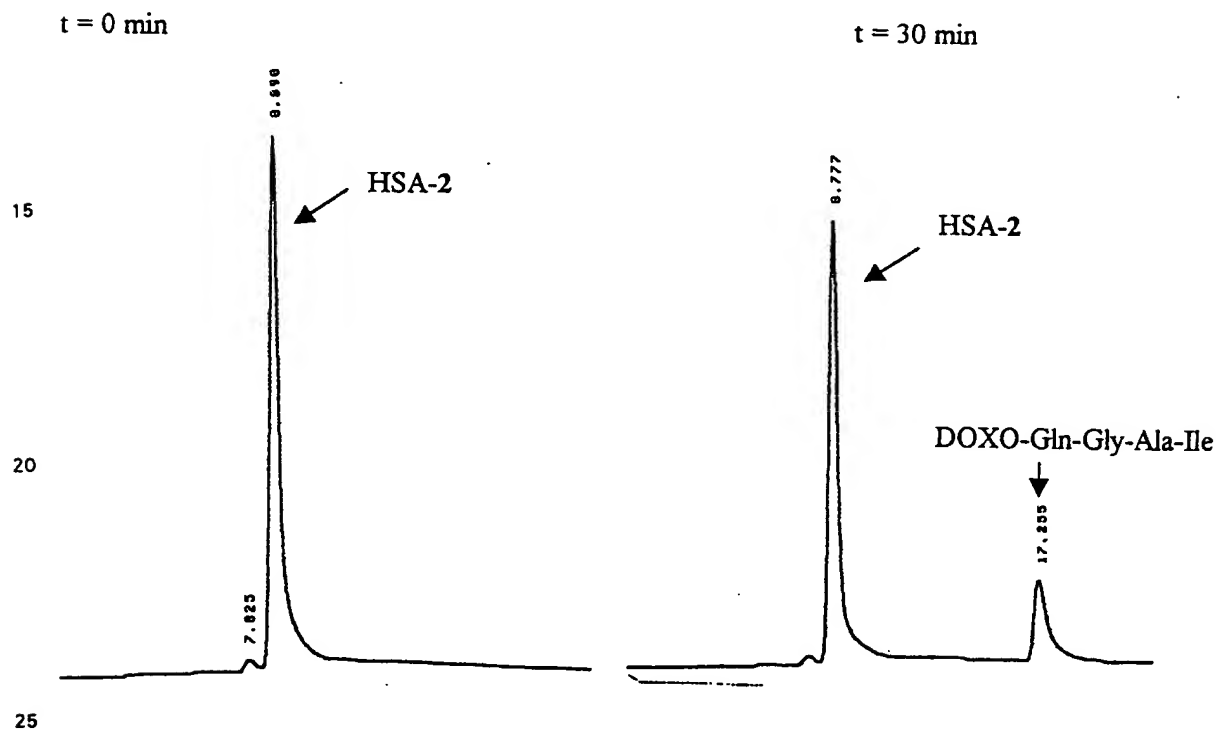


- Die Peptidsequenz Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly wird von der Matrixmetalloprotease MMP9 erkannt und zwischen Isoleucin und Glycin  
25 gespalten. Dies wurde durch folgenden Versuch gezeigt: 200  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Lösung des Albuminkonjugats von 2 mit folgender Struktur (abgekürzt HSA-2):



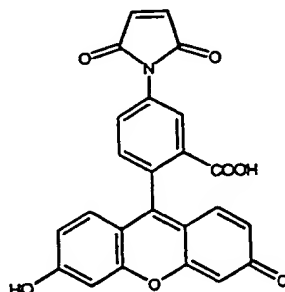
HSA = Human-Serum-Albumin

das durch das in der deutschen Patentanmeldung A19926475.9 vom 10. Juni 1999 beschriebene Verfahren hergestellt wurde, wurde mit Trypsin/Aprotinin aktivierter MMP9 (2 mU von Calbiochem, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die Freisetzung von DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile nach dieser Zeit ist in den untenstehenden Chromatogrammen abgebildet. Gezeigt ist das Chromatogramm von HSA-2 bei  $t = 0$  (Trennung durch HPLC Ausschlußchromatographie mit einer Biosil 250 SEC Säule von der Firma Biorad, Detektion bei  $\lambda = 495$  nm) und nach einer Inkubationszeit mit aktivierter MMP9 von 30 Minuten.



### Beispiel 6

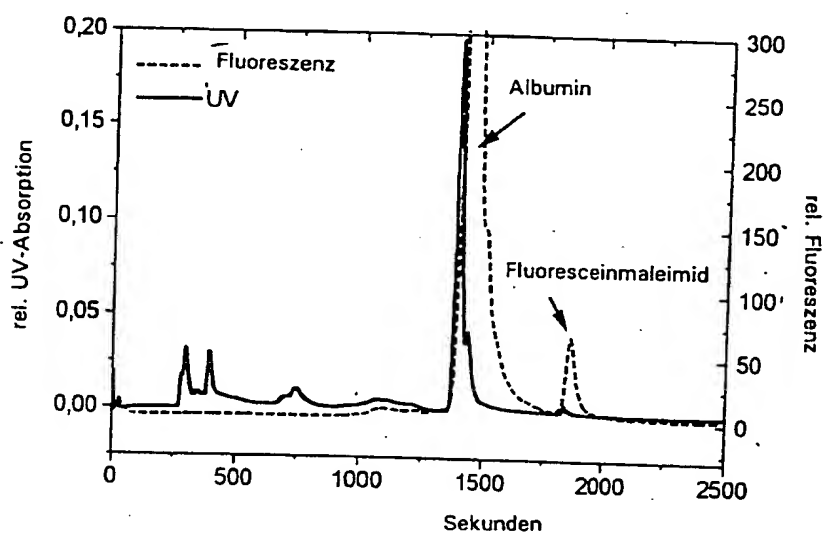
#### Bindung von Fluoresceinmaleiminid an Albumin im Humanplasma





- 32 -

Nach einer 5-minütigen Inkubation von 250  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Fluoresceinmaleinimid-Lösung (Phosphatpuffer - 0,15 M NaCl, 0,004 M Natriumphosphat, pH 5,0) mit 1,0 ml Humanplasma und anschließenden Trennung der Probe mittels der Ausschlußchromatographie (Superdex® 200, Pharmacia), zeigt sich, daß der überwiegende Teil des Fluoresceinmaleinimids an Albumin gebunden ist (s. untenstehendes Chromatogramm):



### Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren  
5 Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine therapeutisch und/oder  
diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren  
Trägerflüssigkeit gelöst wird, dadurch gekennzeichnet, daß als  
therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz eine  
Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff und wenigstens  
10 einem proteinbindenden Molekülrest, die durch einen Spacer  
verbunden sind, verwendet wird, worin der Spacer oder die  
Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer pH-abhängig,  
hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der  
Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem  
Spacer unter Freisetzung des Wirkstoffs oder eines Derivats des  
Wirkstoffs im Körper spaltbar ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein  
Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein  
Analgetikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein  
Antimykotikum, ein Signaltransduktionsinhibitor, ein  
25 Angiogeneseinhibitor oder ein Proteaseinhibitor ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff aus der Gruppe der Anthrazykline, der  
Stickstofflostderivate, der Alkylantien, der Purin- oder  
30 Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane,  
der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-

- 34 -

Alkaloide, der Calicheamicine, der Maytansinoide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die diagnostisch wirksame Substanz ein  
5 oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder/und ein oder mehrere  
10 Kontrastmittel im nahen IR-Bereich aufweist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das proteinbindende Molekül eine  
Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine  
15 Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-Hydroxysuccinimidestergruppe, eine Isothiocyanat-Gruppe, eine Disulfidgruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe oder eine Acetylengruppe ist, die gegebenenfalls substituiert sein kann.
- 20
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spacer ein organischer Molekülrest ist, welcher eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder einen  
aliphatischen Kohlenstoffring mit 1-12 Kohlenstoffatomen, die  
25 teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, und/oder mindestens einem Aromaten enthält, welche gegebenenfalls substituiert sein können.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindung zwischen dem Wirkstoff und  
30 dem Spacer bzw. der proteinbindenden Molekülrest mindestens eine Peptidbindung enthält.

- 35 -

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zusätzlich ein Trägermolekül verwendet wird.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zusammenbringen des Trägermoleküls mit der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz ex vivo erfolgt.
- 10 11. Therapeutisch und/oder diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Wirkstoff, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest aufweist, welcher mit dem Wirkstoff durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Wirkstoff pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist, wobei der Wirkstoff kein Zytostatikum ist.
- 15 12. Diagnostisch wirksame Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Diagnostikum, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest, welcher mit dem Diagnostikum durch einen Spacer verbunden ist, wobei der Spacer oder die Bindung zwischen Spacer und Diagnostikum pH-abhängig, hydrolytisch oder enzymatisch im Körper spaltbar ist.
- 20 13. Verwendung der therapeutisch und/oder diagnostisch wirksamen Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Viruskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akute oder chronisch-entzündliche Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen verursacht sind.
- 25 30

- 36 -

14. Diagnostischer Kit, enthaltend die proteinbindende diagnostisch wirksame Substanz nach einem der Ansprüche 5 bis 12, gegebenenfalls ein Trägermolekül, sowie pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe, Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.
15. Verwendung der diagnostisch wirksamen Substanz nach einem der Ansprüche 5 bis 10 und 12 oder des diagnostischen Kits nach Anspruch 14 zum Nachweis von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden und/oder zum Nachweis des Trägermoleküls und dessen Verteilung im Organismus.
16. Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine diagnostisch wirksame Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, dadurch gekennzeichnet, dass als diagnostisch wirksame Substanz eine Verbindung umfassend ein Diagnostikum und wenigstens einen Protein-bindenden Molekülrest verwendet wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum und der Protein-bindende Molekülrest durch einen Spacer verbunden sind.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung zwischen dem Diagnostikum und dem Protein-bindenden Molekülrest oder der Spacer nicht spaltbar sind.

- 37 -

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum und der Protein-bindende Molekülrest durch eine Amidbindung miteinander verbunden sind.

International Publication No. WO 00/76551 A2

REÇU LE

22 FEV. 2001

*François*

---

Job No.: 6155-81487

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

INTERNATIONAL PATENT OFFICE  
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on  
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)  
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/76551 A2

International Patent Classification <sup>7</sup> :	A 61 K 47/48
International Filing No.:	PCT/EP00/05272
International Filing Date:	June 7, 2000
International Publication Date:	December 21, 2000
Language Submitted in:	German
Language Published in:	German
Priority	
Date:	June 9, 1999
Country:	Germany
No.:	199 26 154.7
Designated States (national):	AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
Designated States (regional):	ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, BR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, CN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



## METHOD FOR THE PRODUCTION OF AN INJECTABLE DRUG PREPARATION

Inventor and

Inventor/Applicant (only for US):

Felix Kratz  
Clinic for Tumor Biology  
Breisacher Strasse 117  
D-79106 Freiburg, Germany

Applicant (for all designated  
states except US):

KTB Tumorforschungs GmbH  
Breisacher Strasse 17  
D-79106 Freiburg, Germany

Agent:

H. Weickmann, et al.  
Kopernikusstrasse 9,  
D-81679 Munich, Germany

Published

With International Search Report.

Before expiration of the period permitted for amendments to the claims. Will be republished if amendments are submitted.

For an explanation of the two letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

### Abstract

The invention relates to a method for the production of injectable drug preparations containing a therapeutically and/or diagnostically active substance which comprises an active ingredient, a spacer molecule, and a minimum of one protein-binding molecule and which, after being brought into contact with the body, covalently binds via the protein-binding molecule to the constituents of the body fluids or to tissue constituents, thus providing a way of transporting the active ingredient which is pH-dependently, hydrolytically, or enzymatically cleavable in the body while the active ingredient is released.

### Description

The present invention refers to a method for the production of injectable drug preparations, containing a therapeutically and/or diagnostically active substance which consists

of an active ingredient, a spacer molecule, and a minimum of one protein-binding molecule and which, after being brought into contact with the body, binds by way of the protein-binding molecule covalently to constituents of body fluids or tissue constituents, thus providing a way of transporting the active ingredient which is pH-dependently, hydrolytically, or enzymatically cleavable in the body while the active ingredient is being released.

The majority of the drugs presently used are low-molecular compounds which, after systemic administration, have a high plasma as well as total clearance. Furthermore, as a result of diffusion processes, they penetrate the tissue structures of the body and, as a rule, show a uniform biodistribution. These two properties are responsible for the fact that only small quantities of the drug reach the site of action and that the drug, due to its distribution into the healthy tissue of the body, provokes side effects. These drawbacks are especially pronounced in drugs with a high cytotoxic potential, such as cytostatics, immunosuppressants, or virostatics.

To improve the selectivity of low-molecular drugs, a number of different approaches have been taken, such as the chemical derivatization of lead structures, the formulation as prodrugs, or the binding of drugs to carrier molecules. The present invention is based on the approach by which drugs are chemically bound to endogenous macromolecules. It is known that there are conjugates in which cytostatics are generally bound to serum proteins, predominantly to certain carrier molecules, such as human serum albumin and human serum transferrin, and which are subsequently administered. These well-known protein conjugates are produced either by coupling the cytostatic ex vivo to the serum protein using a "one-pot procedure" (Patent No. DE 41 22 210 A1), thus subsequently obtaining the resulting albumin-cytostatic conjugate, or by first derivatizing the cytostatic by means of a suitable spacer molecule, by isolating the resulting product, and by coupling the cytostatic thus derivatized in a second step via a maleinimide group to the protein (Patent No. DE 196 36 889 A1 and patent filed under the International Filing No. PCT/DE 97/02000) and by subsequently isolating the resulting albumin-cytostatic conjugate. Both methods have the disadvantage that they use plasma proteins which may contain pathogenic microorganisms. Other drawbacks of the protein-active substance conjugates include their inferior stability and storage life and the degree of technical complexity required for their production.

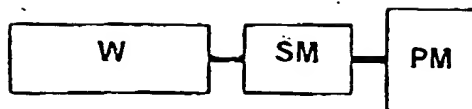
The problem to be solved by the present invention is to overcome these disadvantages. This problem is solved by making available a method for the production of an injectable drug preparation containing a therapeutically and/or diagnostically active substance which is dissolved in an injectable carrier liquid, which is characterized by the fact that the therapeutically and/or diagnostically active substance used is a compound comprising an active ingredient and a minimum of one protein-binding molecular residue which are connected by way of a spacer,

with the spacer or the binding between the active ingredient being pH-dependently, hydrolytically, or enzymatically cleavable in the body. During the cleavage, the active ingredient or a derivative of the active ingredient is released. In this context, a derivative of an active ingredient is defined as a substance which comprises the active ingredient but which, in addition, can contain parts of the spacer or of the groups via which the active ingredient was bound to the protein-binding molecule. The efficacy of the active ingredient should not be impaired by its release as a derivative. Preferably, the efficacy of the active ingredient or its derivative evolves only after the active ingredient or its derivative has been released.

The present invention is based on the surprising discovery that, contrary to the assumptions so far, it is not necessary to combine an active ingredient under defined conditions with a certain carrier and to subsequently administer the product but that it is possible to use therapeutically and/or diagnostically active substances comprising a pharmacological active ingredient and a minimum of one protein-binding molecular entity, which are connected to each other by way of a spacer, directly as injectable drugs since these, after being brought into contact with the body, covalently bind via the protein-binding molecule to body fluid constituents or to tissue constituents, predominantly to serum proteins, in such a way that a way of transporting the active ingredient in vivo is provided, by means of which the active ingredient is able to reach the target cells or the target tissue. Since, according to the present invention, the binding to the spacer molecule or between the active ingredient and the spacer molecule in the therapeutically and/or diagnostically active substance is pH-dependently, hydrolytically, or enzymatically cleavable in the body, the active ingredient is still released specifically to the target site desired.

As a result of their protein-binding properties, injectable drug preparations of therapeutically and/or diagnostically active substances produced according to the present invention fundamentally change and improve the pharmacokinetic profile of the active ingredients. As soon as these therapeutically and/or diagnostically active substances reach body fluids, they bind covalently to body fluid constituents or tissue constituents, preferably to serum proteins, and even better to serum albumin, thus being available as macromolecular prodrugs which transport the active ingredient to the targeted site and/or release it in a metered form.

The therapeutically and/or diagnostically active substance obtained according to the present invention comprises an active ingredient W, a spacer molecule SM, and a minimum of one protein-binding molecule PM and has the following structure:

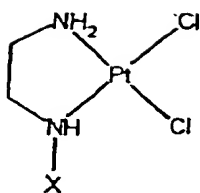


In addition, the substance obtained according to the present invention may contain labeled groups or labeled elements or molecules, in which case the substance is especially suitable for diagnostic purposes. Preferred labeling substances are one or more radionuclide(s), ligands comprising one or more radionuclide(s), one or more positron emitter(s), one or more NMR contrast agent(s), one or more fluorescing compound(s) and/or one or more contrast agent(s) in the near IR range.

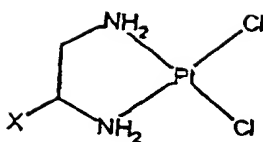
A diagnostic agent within the scope of this invention, for example, is an active ingredient labeled as described above or one or more fluorescent compound(s) and/or one or more contrast agent(s) in the near IR range.

The active ingredient is a cytostatic agent, an immunosuppressant, a virostatic agent, an antirheumatic agent, an analgesic agent, an antiphlogistic agent, an antibiotic, an antimycotic, a signal transduction inhibitor, an angiogenesis inhibitor, or a protease inhibitor.

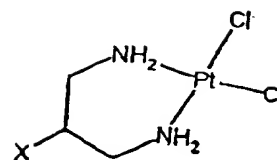
Preferred cytostatics for the production of injectable therapeutically and/or diagnostically active substances according to the present invention include the anthracyclines doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantrone, and ametantrone and allied derivatives thereof, the alkylating agents chlorambucil, bendamustin, melphalan, and oxazaphosphorines and allied derivatives of these, the antimetabolites methotrexate, 5-fluorouracil, 5'-deoxy-5-fluorouridine, and thioguanine, and allied derivatives thereof, the taxanes paclitaxel and docetaxel, and allied derivatives thereof, the camptothecines topotecan, irinotecan, 9-aminocamptothecine, and camptothecine, and allied derivatives thereof, the podophyllotoxin derivatives etoposide, teniposide, and mitopodozide, and allied derivatives thereof, the vinca alkaloids vinblastine, vincristine, vindesine, and vinorelbine, and allied derivatives thereof, the calicheamicines, the maytansinoids, and a compound of general formula I through XII:



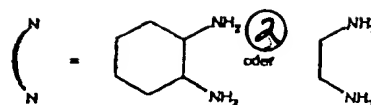
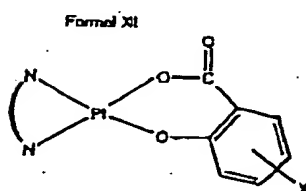
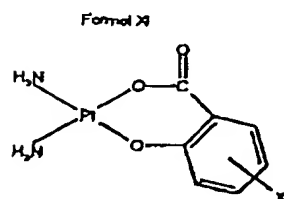
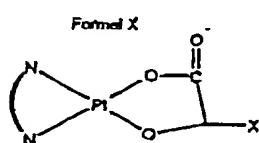
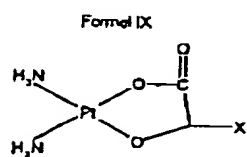
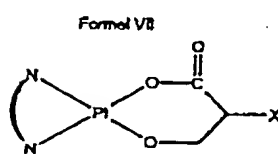
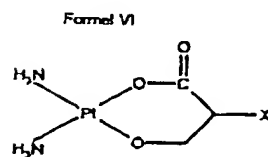
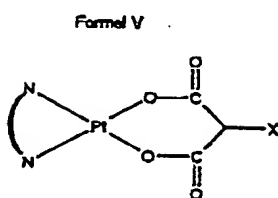
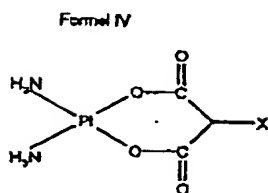
①  
Formel I



Formel II



Formel III



Key: 1      Formula  
      2      or

where X stands for the spacer molecule SM or for the protein-binding molecule PM.

Preferred cytokines for the production of therapeutically and/or diagnostically active substances according to the present invention include interleukin 2, interferon  $\alpha$ -2a, interferon  $\alpha$ -2b, interferon  $\beta$ -1a, interferon  $\beta$ -1b, interferon  $\gamma$ -1b, and allied derivatives thereof. As a rule, the cytokines used are genetically produced drugs.

Preferred immunosuppressants for the method according to the present invention include cyclosporin A and allied derivatives thereof and tacrolimus (FK 506) and allied derivatives thereof.

Antirheumatic agents especially suitable for use in the method according to the present invention are methotrexate and allied derivatives thereof.

Preferred analgesics for the method according to the present invention include salicylic acid derivatives, such as acetyl salicylic acid and allied derivatives thereof, drug derivatives which contain an acetic or propionic acid group, such as diclofenac or indomethacin and ibuprofen or naproxen, respectively, and aminophenol derivatives, such as paracetamol.

Preferred antimycotic agents for the method according to the present invention include amphotericin B and allied derivatives thereof.

Preferred virostatic agents for the method according to the present invention include nucleoside analogs, such as acyclovir, ganciclovir, idoxuridine, ribavirin, vidaribine, zidovudine, didanosine, and 2'3'-dideoxycytidine (ddC), and allied derivatives thereof, and amantadine.

Preferred antibiotics for the method according to the present invention include sulfonamides, such as sulanilamide, sulfacarbamide, and sulfamethoxydiazine, and allied derivatives thereof, penicillins, such as 6-aminopenicillanic acid, penicillin G and penicillin V, and allied derivatives thereof, isoxazoyl penicillins (e.g., oxacillin, cloxacillin, flucloxacillin), and allied derivatives thereof,  $\alpha$ -substituted benzyl penicillins (e.g., ampicillin, carbenicillin, pivampicillin, amoxicillin) and allied derivatives thereof, acylamino penicillins (e.g., mezlocillin, azlocillin, piperacillin, apalocillin), and allied derivatives thereof, amidino penicillins, such as mecillinam, atypical  $\beta$ -lactams, such as imipenam and aztreonam, cephalosporins, such as cefalexin, cefradin, cefaclor, cefadroxil, cefixim, cefpodoxim, cefazolin, cefazedon, cefuroxim, cefamandol, cefotiam, cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, latamoxef, cefotaxim, ceftriaxon, ceftizoxime, cefmonoxime, ceftazidime, cefsulodin, and cefoperazone, and allied derivatives thereof, tetracyclines, such as tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, rolitetracycline, doxycycline, and minocycline, and allied derivatives thereof, chloramphenicols, such as chloramphenicol and thiamphenicol and allied derivatives thereof, gyrase inhibitors, such as nalixidic acid, pipemidic acid, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, and enoxacin, and allied derivatives thereof, and antituberculous agents, such as isoniazid and allied derivatives thereof.

The spacer molecule SM is an organic molecule consisting of an aliphatic carbon chain and/or an aliphatic carbon ring and/or a minimum of one aromatic hydrocarbon. The aliphatic carbon chain/ring preferably consists of 1-12 carbon atoms which may be partially substituted with oxygen atoms and which may optionally be substituted in particular with one or more water-soluble groups, such as sulfonic acid groups, aminoalkyl groups, or hydroxy groups. Preferably, the aromatic hydrocarbon is a benzene ring which may optionally be substituted, for example, with the water-soluble groups mentioned above. To improve the water solubility, the aliphatic carbon chain can contain oxygen atoms and thus be derived from an oligoethylene oxide chain or an oligopropylene chain, for example, a diethylene glycol chain, a triethylene glycol chain or a dipropylene glycol chain.

Preferably the protein-binding molecule PM is a maleinimide group, a haloacetamide group, a haloacetate group, a pyridyldithio group, an N-hydroxysuccinimide ester group, or an isothiocyanate group. This molecule may also be a disulfide group, a vinylcarbonyl group, an aziridine group, or an acetylene group. The disulfide group is preferably activated, in most cases in that a thionitrobenzoic acid (e.g., 5'-thio-2-nitrobenzoic acid) is the exchangeable group. The groups may optionally be substituted. The maleinimide group, the pyridyldithio group, and the N-hydroxysuccinimide group may optionally be substituted with alkyl or with the above-mentioned water-soluble groups. PM has protein-binding properties, i.e., in a physiological environment, it binds covalently to certain amino acids on the protein surface. In the course of this, the maleinimide group, the haloacetamide group, the haloacetate group, the pyridyldithio group, the disulfide group, the vinylcarbonyl group, the aziridine group, and the acetylene group preferably react with HS groups of cysteines while the N-hydroxysuccinimide ester group and the isothiocyanate group preferably react with the amino group of lysines on the protein surface.

After parenteral administration, the therapeutically and/or diagnostically active substance which is made available by the method according to the present invention in the form of an injectable drug preparation reaches the blood stream and is able to bind to proteins via the protein-binding molecule PM. Preferably, it binds to serum proteins, in particular to serum albumin. It was found that in the physiological environment, the therapeutically and/or diagnostically active substance reacts especially with the free cysteine-34 of the albumin via the maleinimide group, the haloacetamide group, the haloacetate group, the pyridyldithio group, the disulfide group, the vinylcarbonyl group, the aziridine group, or the acetylene group and in this manner is covalently bound. Pharmacologically active substances with an N-hydroxysuccinimide ester group or an isothiocyanate group preferably bind to the  $\epsilon$ -amino group of lysines on the protein surface of albumin or other serum proteins. Serum proteins, such as albumin or

transferrin, have an extremely long half-life in the systemic circulatory system (up to 19 days according to T. Peters, Jr. (1985): *Serum albumin*. *Adv. Protein. Chem.* 37, pp. 161-245). Due to an increased permeability of the vascular walls of malignant, infected, or inflamed tissue for macromolecules, serum albumin moves specifically into this target tissue (H. Maeda and Y. Matsumura, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, pp. 193-210). As a result, an active substance that is bound to albumin can more specifically reach the site of action. In addition, the covalent bond between the active substance and the serum proteins in the blood stream ensures that a diffusion of the active substance into healthy tissue structures of the body is prevented or that the active substance is not eliminated via the kidneys, thus reducing the extent of damage that the active substance that is not bound to the serum proteins can cause to such structures and the kidneys. Thus, the pharmacokinetic profile of the active substance is changed and improved since its efficacy is increased because it accumulates at the site of action and since, at the same time, the toxic effects on the healthy systems of the body are reduced.

The therapeutically and/or diagnostically active substances used according to the present invention contain a defined chemical bond in the spacer molecule or between the spacer molecule SM and the active substance W. This bond is pH-dependently, preferably acid-sensitively cleavable or hydrolytically cleavable, or it contains a minimum of one bond which is enzymatically cleaved in the body, preferably a peptide bond.

Bonds that are cleaved by hydrolysis while releasing the active substance are, for example, ester bonds or metal complex bonds, such as they are present in platinum-dicarboxylate complexes, while a diamine diaquo platinum(II) complex is released. The acid-sensitively cleavable bonds are acetal bonds, ketal bonds, imine bonds, hydrazone bonds, carboxylhydrazone bonds, or sulfonylhydrazone bonds or cis-aconityl bonds or bonds containing a trityl group, wherein the trityl group may be substituted or unsubstituted. Preferred therapeutically and/or diagnostically relevant acid-sensitive bonds are described, for example, in Kratz et al. (1990) *Crit. Rev. Ther. Drug. Car. Sys.* 16 (3), pp. 245-288. As a rule, the peptide sequence in the realized peptide bonds consists of approximately 2-30 amino acids. The peptide sequence is preferably tailored specifically to the substrate specificity of certain enzymes, which will hereinafter be referred to as target enzymes, in the body, so that the peptide sequence or a portion of this sequence is recognized by an enzyme in the body and the peptide is cleaved. According to another embodiment according to the present invention, the enzymatically cleavable bond is a bond that is not a peptide bond. Examples include carbamate bonds which release the active substance or an active substance derivative by way of enzymes that are specific to a certain disease, e.g., glutathion S transferases, glucuronidases, and galactosidases. It is also possible for an enzymatically cleavable bond to consist of a peptide sequence and one of the



above-mentioned bonds that is not a peptide bond. The target enzymes can be either endogenous enzymes or enzymes that are present in microorganisms or that are produced by microorganisms.

As a rule, the target enzymes are proteases, serin proteases, plasminogen activators, and peptidases, for example, matrix metalloproteases (MMP) or cysteine proteases which are produced in greater quantities or activated in the presence of rheumatoid arthritis or cancer, which leads to an excessive degeneration of tissue, to inflammations, and to the formation of metastases. Target enzymes are, in particular, MMP 2, MMP 3, and MMP 9 which are involved as proteases in the pathological processes mentioned (J. Vassalli and M. S. Pepper (1994), Nature 370, pp. 14-15; P. D. Brown (1995), Advan Enzyme Regul. 35, pp. 291-301).

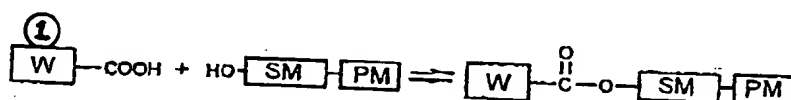
Other proteases that are target enzymes for therapeutically and/or diagnostically active substances according to the present invention are cathepsins, in particular cathepsin B, H, and L, which have been identified as the key enzymes in inflammatory and malignant diseases.

The types of bonds mentioned above ensure that after absorption of the conjugate, the active substance or a correspondingly active derivative is extracellularly and/or intracellularly released by the cell at the site of action desired and can develop its therapeutic and/or diagnostic action.

The cleavage can also proceed in such a way that instead of cleaving the active substance as such, a derivative of the active substance is cleaved. Thus, such a derivative contains the active substance and groups which are bonded to the active substance and which are derived from the spacer molecule, depending on the site at which the desired cleavage took place.

The therapeutically and/or diagnostically active substance used in the method according to the present invention can be produced according to any one of the general descriptions below:

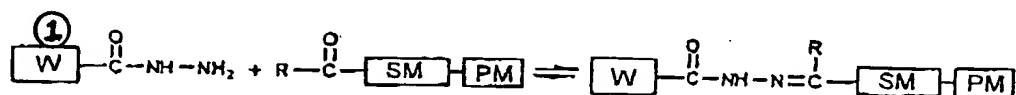
Active substances which contain an HOOC group are derivatized as described below:



Key: 1      Active substance

The esterification is carried out by means of the conventional methods known to those skilled in the art.

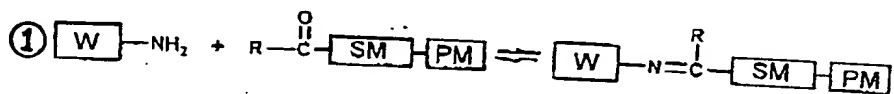
It is also possible to convert the HOOC group into a hydrazide group, e.g., by means of a reaction with tert-alkyl carbazates and by the subsequent cleavage with acids (described in Patent No. DE 196 36 889), and to react the drug which contains a hydrazide group with a spacer which comprises PM and SM and which contains a carbonyl component, for example, as described in Patent No. DE 196 36 889 A1 or in the patent filed under International Filing No. PCT/DE 97/02000:



R = H, alkyl, phenyl, substituted phenyl

Key: 1 Active substance

Active substances according to the present invention which contain an H<sub>2</sub>N group are derivatized as follows:



R = H, alkyl, phenyl, substituted phenyl

Key: 1 Active substance

The reaction to obtain the imine derivatives is carried out using conventional methods which are known to those skilled in the art.

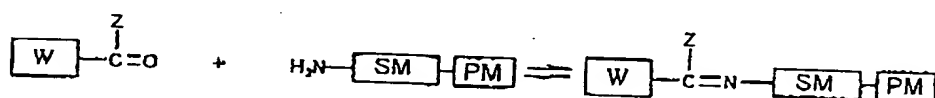
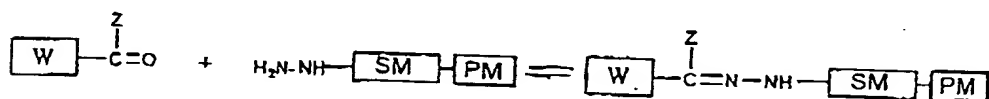
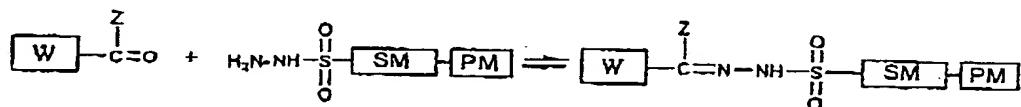
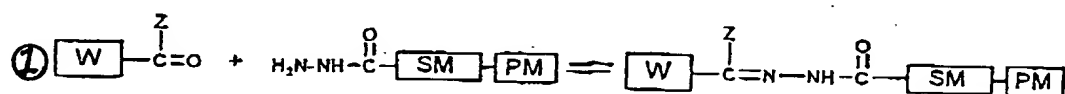
Active substances according to the present invention which contain an HO group are derivatized as follows:



Key: 1 Active substance

The esterification is carried out by means of conventional methods which are known to those skilled in the art.

Active substances according to the present invention which contain a carbonyl component are derivatized as follows:

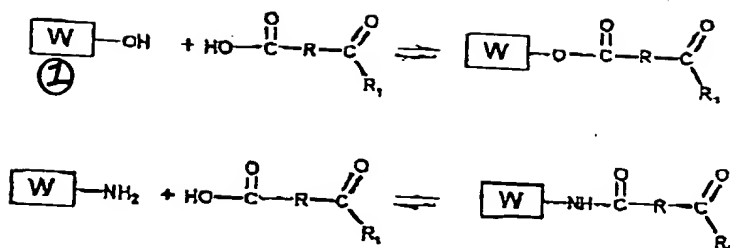


Z = chemical group of the active substance

Key: 1 Active substance

The reaction to produce the carboxyhydrazone, sulfonylhydrazone, hydrazone, and imine derivatives is carried out following the method described, e.g., in Patent No. DE 196 36 889 A1 or in patent filed under the International Filing No. PCT/DE 97/02000, or by means of conventional methods which are known to those skilled in the art.

It is also possible to convert an HO group or an NH<sub>2</sub> group of an active substance into a carbonyl component, e.g., by esterification or amide formation with a carbonyl component containing a carboxylic acid according to the general formula below:



Key: 1      Active substance

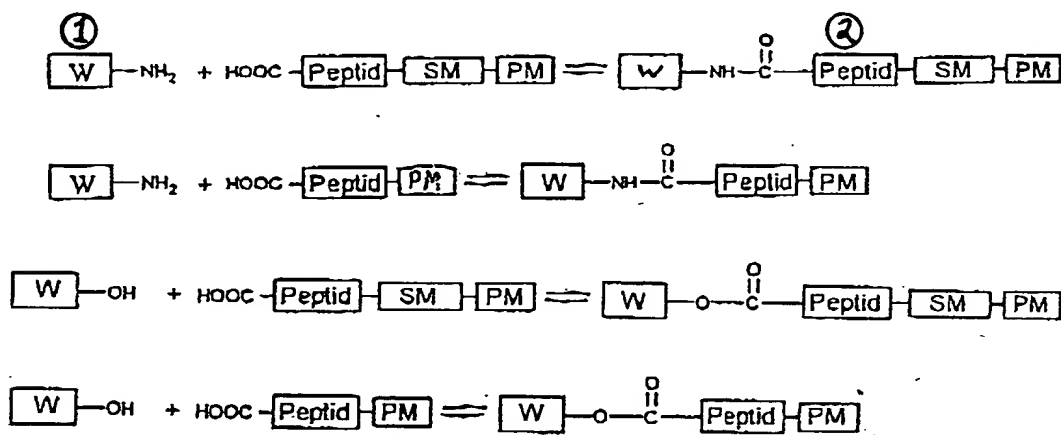
where R stands for an aliphatic carbon chain and/or an aliphatic carbon ring and/or an aromatic hydrocarbon and where R<sub>1</sub> is H, alkyl, phenyl, or a substituted phenyl group. R generally has 1 to 12 carbon atoms which may optionally be substituted, e.g., with water-soluble groups, such as sulfonic acid groups, aminoalkyl groups or hydroxy groups. As a rule, the aromatic hydrocarbon is a benzene ring which may optionally be substituted, for example, with the water-soluble groups mentioned above.

The carbonyl component can also be introduced using other chemical reactions, e.g., an electrophilic substitution at the HO or NH<sub>2</sub> group of the active ingredient with a suitable carbonyl component.

The active ingredients thus derivatized which now contain a carbonyl component are subsequently reacted as described in the methods described above with the protein-binding spacer molecules which contain an amino group, a hydrazide group, or a hydrazine group to form the corresponding carboxylhydrazone, sulfonylhydrazone, hydrazone, and imine derivatives. The acid-sensitive cleavage of these bonds thus leads to the release of the derivatized active ingredient which contains a carbonyl component.

The spacers which comprise the protein-binding molecule PM and the spacer molecule SM can be produced, e.g., according to methods which are described, among other things, in Patent No. DE 196 36 889 A1; by U. Beyer et al., Chemical Monthly 128, p. 91, 1997; by R. S. Greenfield et al., Cancer Res. 50, p. 6600, 1990; by T. Kaneko et al., Bioconjugate Chem. 2, p. 133, 1991; Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson, Academic Press, 1996; or in U.S. Patent No. 4,251,445.

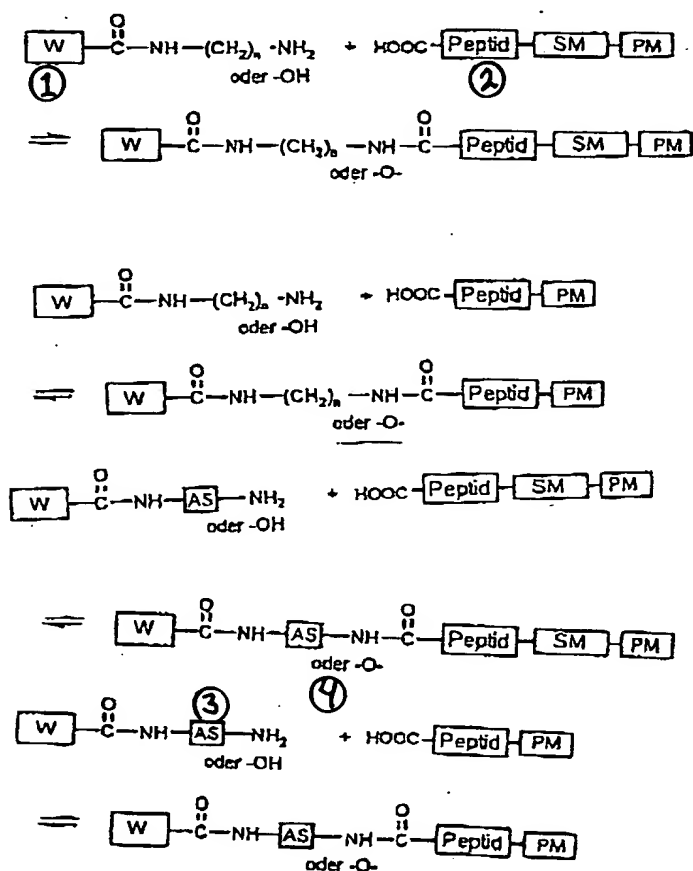
Therapeutically and/or diagnostically active substances for use in the present invention which contain a peptide bond can be produced by reacting a peptide which consists of 2 to approximately 30 amino acids with a protein-binding compound in such a way that a protein-binding molecule is introduced either directly or via spacer molecule SM to the N-terminal end of the peptide. The synthesis of such protein-binding peptide derivatives preferably takes place by means of a solid-phase synthesis which is known to those skilled in the art, where in the last step of the peptide synthesis, a protein-binding spacer molecule containing a carboxylic acid, e.g., a maleinimidocarboxylic acid, is bound by means of the peptide bond to the N-terminal end of the peptide, and the protein-binding peptide is subsequently cleaved off the solid phase. The peptide derivatives obtained in this manner can be reacted with an active substance, which contains an  $H_2N$  or an  $HO$  group, in the presence of a condensation agent, such as  $N,N'$ -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or  $N$ -cyclohexyl- $N'$ -(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl- $p$ -toluenesulfonate (CMC), (benzotriazol-1-yloxy)trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (pyBOP) or  $O$ -benzotriazol- $N,N,N',N'$ -tetramethyluronium hexafluorophosphate, with the optional addition of  $N$ -hydroxysuccinimide or a water-soluble  $N$ -hydroxysuccinimide, such as  $N$ -hydroxysuccinimide-3-sulfonic acid sodium salt or 1-hydroxybenzotriazol and/or in the presence of a base, such as  $N$ -methylmorpholine or triethylamine, to form the corresponding protein-binding active substance-peptide derivatives.



Key: 1      Active substance  
       2      Peptide

Furthermore, it is possible to introduce an  $H_2N$  group or an  $HO$  group via the  $HOOC$  group of the active substances, for example, by means of derivatization with the amino acids

(AS) lysine, serine, or threonine via their  $\alpha$ -amino groups or via the  $\alpha$ -amino group with a diamino compound of the general formula  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  or with an alcohol amine of the general formula  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CN}_2)_n-\text{OH}$ , where  $n = 1-12$ , and to subsequently react these derivatives with the peptide derivatives mentioned above to form the corresponding protein-binding active substance-peptide derivatives.

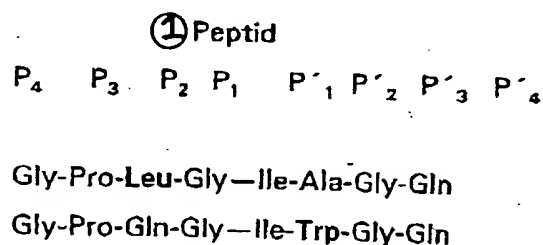


AS = Lysine, serine, or threonine

Key: 1      Active substance  
 2      Peptide  
 3      Amino acid  
 4      or

The substrate specificity of target enzymes, such as MMP 2, MMP 3, MMP 9, cathepsin B, H, and L, is well known (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, pp. 6427-6432; S. Shuja, K. Sheahan, and M. J. Murnane (1991), *Int. J. Cancer* 40, pp. 341-346; T. T. Lah and J. Kos (1998), *Biol. Chem.* 379, pp. 125-130).

Thus, for example, octapeptides ( $P_4$ - $P'_4$ ) which simulate the cleavage sequence of the collagen chain and which are especially effectively cleaved by MMP 2 and 9 have been identified for MMP 2 and MMP 9.



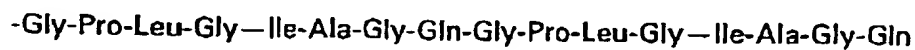
(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, pp. 6427-6432).

Key: 1      Peptide

The peptides are enzymatically cleaved only at the  $P_1$ - $P'_1$  bond.

In addition, substrate-specific dipeptides with the sequence -Arg-Arg-, -Phe-Lys-, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu, or Ala-Leu-Ala-Leu (B. Werle, E. Ebert, W. Klein, and E. Spiess (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, pp. 157-164; B. Ulrich, E. Spiess, R. Schwartz-Albiez, and W. Ebert (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, pp. 404-414) are known for cathepsin B.

The peptide sequence which contains the predetermined breaking point of peptide that is relevant for the target enzyme can also be built up in such a manner that the predetermined breaking point of peptide is repeated several times, for example, by:



or





directly with the cytokine. The reaction of the cytokine with a spacer molecule containing a protein-binding group and a carboxylic acid takes place in the presence of a condensation agent, such as N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate (CMC), optionally with an addition of N-hydroxysuccinimide or N-hydroxysuccinimide-3-sulfonic acid sodium salt, to form the corresponding protein-binding cytokine derivatives. The purification of the cytokines derivatized in this manner is preferably carried out using exclusion chromatography. The reactions described above are known to those skilled in the art (Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Following the synthesis of the therapeutically and/or diagnostically active substances, an injectable drug preparation containing the therapeutically and/or diagnostically active substance in a suitable carrier liquid is produced. The therapeutically and/or diagnostically active substance preferably has the form of a lyophilisate, to which, prior to or after the lyophilization, conventional carriers and/or pharmaceutical auxiliary agents, such as polysorbates, glucose, lactose, mannose, citric acid, tromethamol, triethanolamine, or aminoacetic acid, can be added. The injectable drug preparation should be produced in such a manner that the protein-binding molecule is not deactivated, cleaved, or hydrolyzed when it is dissolved in the injectable carrier liquid. Furthermore, it must be ensured that the acid-sensitive bond in the therapeutically and/or diagnostically active substance which is an ester, acetal, ketal, imine, hydrazone, carboxylhydrazone, or sulfonylhydrazone bond, is not hydrolyzed. The protein-binding molecules used according to the present invention are base-sensitive; therefore, the pH value of the carrier liquid should not exceed a pH value of 8.0. The pH value is preferably in a range from pH 4.0 to pH 7.0, but especially in a range between pH 6.0 and pH 7.0. It goes without saying that the carrier liquid must be physiologically compatible.

Preferred carrier liquids are roughly isotonic salt buffers, e.g., phosphate, acetate or citrate buffers, such as 0.004 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 6.0-7.0, or 0.01 M sodium acetate, 0.14 M NaCl, pH 5.0-6.5). The carrier liquid used can also be an isotonic sodium chloride solution. The salt buffers can contain conventional carriers and/or auxiliary agents, such as polysorbates, glucose, lactose, mannose, citric acid, tromethamol, triethanolamine, or aminoacetic acid.

The solubility of the therapeutically and/or diagnostically active substance in the injectable carrier liquid can be improved by the addition of pharmaceutical solvents, such as ethanol, isopropanol, 1,2-propylene glycol, glycerol, macrogols, polyethylene glycols, or polyethylene oxide, or by the addition of solubility promoters, e.g., Tween, Cremophor, or polyvinylpyrrolidone. For this purpose, the therapeutically and/or diagnostically active substance

is either dissolved in the pharmaceutical solvent or solubility promoter and subsequently diluted with a salt buffer, or a carrier liquid containing the salt buffer and a minimum of one pharmaceutical solvent or solubility promoter are used directly to dissolve the therapeutically and/or diagnostically active substance. The concentrations of the pharmaceutical substances or solubility promoters should not exceed the quantities prescribed by the Federal Food, Drug and Cosmetic Act (AMG, Arzneimittelgesetz).

The carrier liquid is preferably selected to ensure that the dissolving process of the therapeutically and/or diagnostically active substance in the carrier liquid is concluded after a few minutes, thus making it possible to prepare an injectable drug preparation at the bedside of the patient.

It is also possible to bring an additional carrier molecule, such as one of those mentioned in the introduction, into contact with the active substance, with the active substance being able to bind to this carrier molecule. According to another embodiment of this invention, the present invention thus comprises the step of bringing the carrier molecule *ex vivo* into contact with the protein-binding therapeutically and/or diagnostically active substance subsequently administering it parenterally. Thus, if desired or necessary, the selectivity of the therapeutically and/or diagnostically active substance for a carrier molecule, for example, albumin, can be improved. The carrier molecules are preferably selected from the group mentioned, in particular from serum proteins.

Thus, the therapeutically and/or diagnostically active substance which was produced using the method according to the present invention is useful in the treatment of cancer diseases, viral diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases and/or diseases that are caused by bacteria, fungi, or other microorganisms.

Another subject matter of the present invention refers to a therapeutically and/or diagnostically active substance with a content of a minimum of one active ingredient which is characterized by the fact that it contains a minimum of one protein-binding molecular residue which is connected via a spacer to the active ingredient, with the spacer or the bond between the spacer and the active ingredient being pH-dependently, hydrolytically or enzymatically cleavable in the body and with the active ingredient being released, with the active ingredient not being a cytostatic.

Yet another subject matter of the present invention relates to a diagnostically active substance with a content of a minimum of one diagnostic agent which is characterized by the fact that it contains a minimum of one protein-binding molecular residue which is bound to the diagnostic agent by means of a spacer, with the spacer or the bond between the spacer and the diagnostic agent being pH-dependently, hydrolytically or enzymatically cleavable in the body

and with the diagnostic agent being released. As already mentioned above, the diagnostic agent preferably comprises one or more radionuclides, ligands that comprise one or several radionuclide(s), one or several positron emitter(s), one or several NMR contrast agent(s), one or several fluorescent compound(s) and/or one or several contrast agents in the near IR range.

Another embodiment according to the present invention relates to a diagnostic kit containing a protein-binding diagnostically active substance according to the present invention, possibly in combination with the carrier molecule and pharmaceutically compatible auxiliary agents, carrier substances and/or diluting agents, selected in particular from those mentioned above. The diagnostic kit according to the present invention can preferably be used to detect the diseases mentioned above or to detect carrier molecules and/or their distribution in the organism.

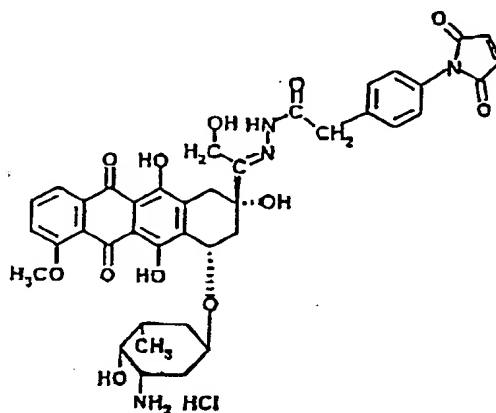
Yet another subject matter of the present invention relates to a method for the production of an injectable drug preparation containing a diagnostically active substance which is dissolved in an injectable carrier liquid, which method is characterized by the fact that the diagnostically active substance used is a compound comprising a diagnostic agent and a minimum of one protein-binding molecular residue. The diagnostic agent can be one of the compounds mentioned above, for example, one or several radionuclide(s), ligands comprising one or several radionuclide(s), one or several positron emitter(s), one or several NMR contrast agent(s), one or several fluorescent compound(s) and/or one or several contrast agents in the near IR range. The diagnostic agent and the minimum of one protein-binding molecular residue can be linked by a spacer. In this case, it is preferable if the spacer or the bond that connects the two components is not cleavable. Examples of bonds which are not cleavable in the body and which can be present in the bond to the diagnostically active substance are amide bonds, saturated or unsaturated carbon-carbon bonds or bonds between carbon and a hetero atom,  $-C-X-$ , with X preferably standing for O, N, S or P. A preferred bond is the amide bond. The release of the therapeutically active substance is to be preferred since, as a rule, the low-molecular active ingredient must interact with its molecular target in order to be able to develop its efficacy. In diagnostically active substances, on the other hand, a release of the protein-bound diagnostic agent is not necessarily required although such a release may be provided for. Therefore, according to the present invention, the diagnostically active substance can be bound to the spacer molecule either via a bond that is not cleavable in the body or it can be bound directly to the protein-binding group without the presence of a spacer molecule SM.

The following examples will explain this invention in greater detail.

Example 1

## Production of DOXO-HYD

The pharmacologically active substance shown below (abbreviated as DOXO-HYD) comprises the cytostatic agent doxorubicin, a maleinimide group as the protein-binding molecule PM, and a phenylacetylhydrazone spacer as a spacer molecule SM. The bond between doxorubicin and the spacer molecule SM is an acid-sensitive carboxylhydrazone bond:



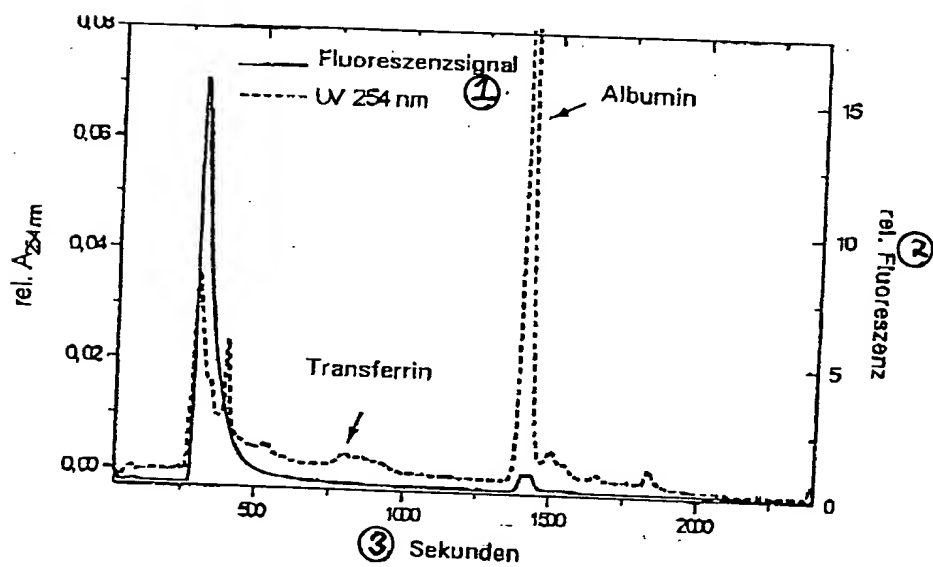
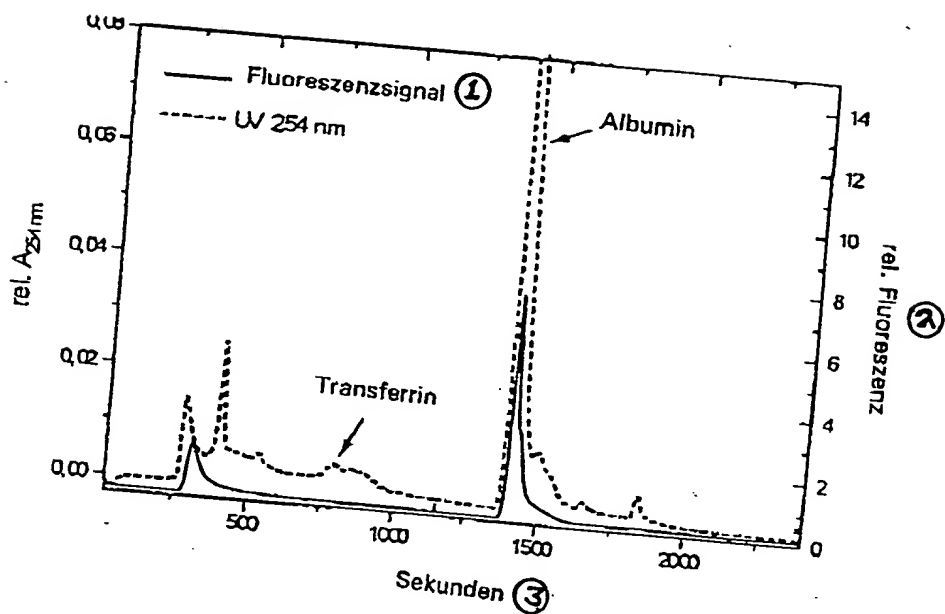
10.51 mg of DOXO-HYD are dissolved by shaking it in 2.0 mL of 1,2-propylene glycol, and subsequently this solution is diluted with 8.0 mL of phosphate buffer (0.004 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 6.5) and homogenized (concentration of DOXO-HYD in the carrier liquid  $\approx 1300 \mu\text{M}$ ). The injectable drug preparation of DOXO-HYD thus prepared was administered intravenously to laboratory animals (see below).

Example 2

## Binding DOXO-HYD to human plasma

After DOXO-HYD reaches the blood stream, it binds to serum proteins, preferably to serum albumin, which means that DOXO-HYD is present, among other things, in the form of an acid-sensitive albumin-doxorubicin conjugate.

Incubation studies of human blood plasma with DOXO-HYD at  $37^\circ\text{C}$  show that after an incubation time of 5 min, the major portion of DOX-HYD [sic; DOXO-HYD] is covalently bound to albumin. (A) in contrast to free doxorubicin (B). This is shown in the chromatograms below (A and B):



Key: 1 Fluorescence signal  
 2 Relative fluorescence  
 3 Seconds

After conclusion of the incubation, the plasma sample was separated in a POROS® 20 anion exchange column (detection of the proteins at 254 nm, detection of the anthracycline by means of fluorescence).

### Example 3

The efficacy of DOXO-HYD in vivo

The biological data listed below clearly show the in-vivo efficacy of DOXO-HYD compared to free doxorubicin: In the so-called RENCA (renal cell carcinoma) model, the antitumoral efficacy of doxorubicin was compared to that of DOXO-HYD, using roughly the same toxic dose (intravenous therapy for 10 days following an injection of approximately 1 million renal carcinoma cells into the left kidney).

Animals: Balb/c mice, female; tumor: RENCA, renal cell carcinoma

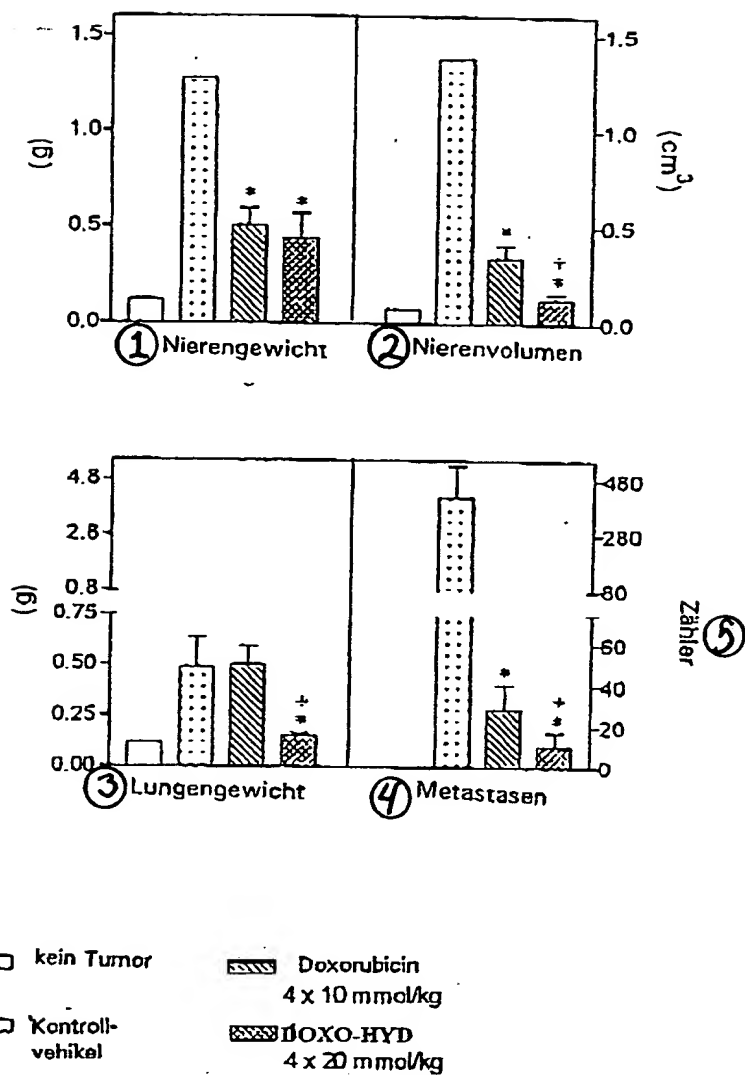
Treatment: day (d) 10, 13, 17, and 20 intravenously (i.v.), end of experiment on d 24

Anzahl der Mäuse ①	Substanz ②	Dosis ③	Durchschnittliche Körpergewichts- abnahme (%) d 1-24 ④
10	Kontrolle ⑤		
10	Doxorubicin	4 x 10 mmol/kg	-15
10	DOXO-HYD	4 x 20 mmol/kg	-15

- Key:
- 1 Number of mice
  - 2 Substance
  - 3 Dose
  - 4 Average loss of body weight (%)  
d 1-24
  - 5 Control

The results of this experiment are listed in the tables below. DOXO-HYD is shown to have an excellent antitumoral effect and, compared to the control group and the group treated with doxorubicin, causes a pronounced reduction of the renal tumor volume and of the number of lung metastases.

Weight and volume of the kidneys and kidney tumors and number of lung metastases



\* significant with respect to the control group (control)

+ significant with respect to the group to which doxorubicin was administered

Key:

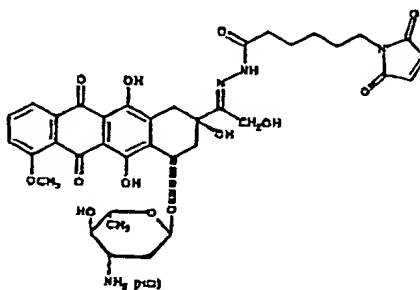
- 1 Weight of kidneys
- 2 Volume of kidneys
- 3 Weight of the lung
- 4 Metastases
- 5 Counter
- 6 No tumor
- 7 Control vehicle



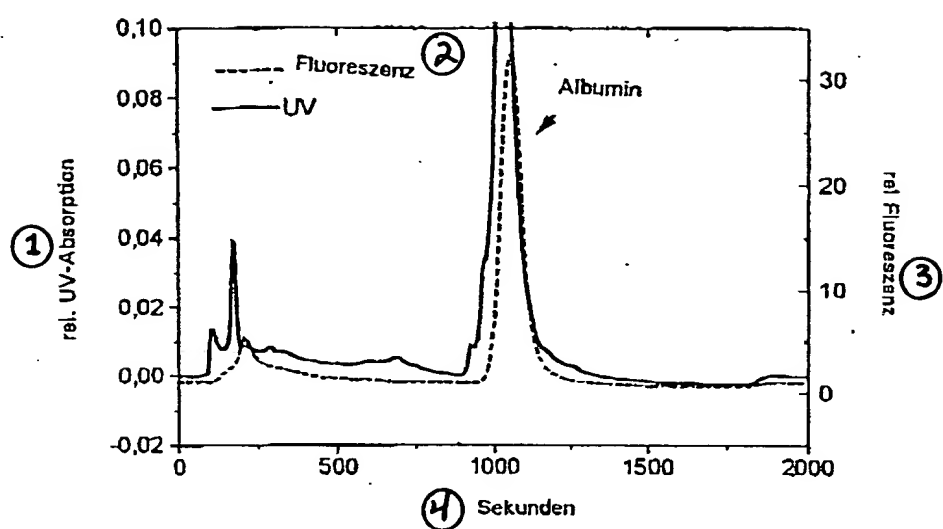
Example 4

Binding DOXO-EMHC to albumin in human plasma

1.6 mg of the 6-maleinimidocapronic acid hydrazone derivative of doxorubicin (abbreviated as DOXO-EMHC) with the structural formula below



are dissolved in 1.0 mL of phosphate buffer (0.15 M NaCl, 0.004 M sodium phosphate, pH 6.5) at room temperature (2000  $\mu$ M solution). When 250  $\mu$ L of this solution are incubated with 1.0 mL of human plasma for 30 sec at 37°C and the sample is subsequently separated in a weak anion exchanger (from POROS®), it can be seen that the major portion of DOXO-EMHC is bound to albumin (see the chromatogram below):

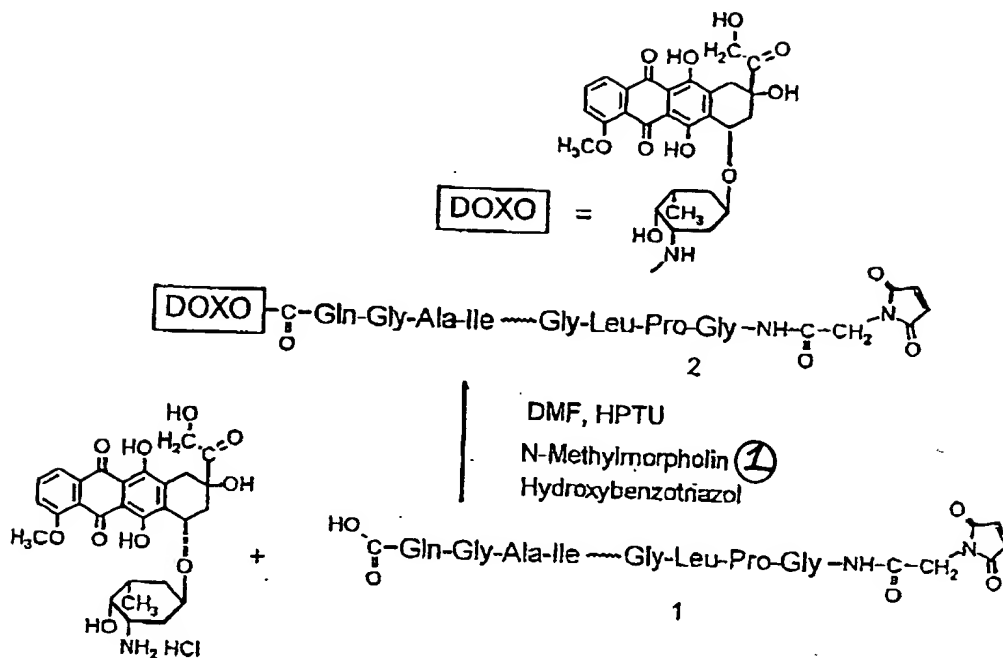


Key: 1 Relative UV absorption  
 2 Fluorescence  
 3 Relative fluorescence  
 4 Seconds

#### Example 5

Binding a doxorubicin-maleinimide-peptide derivative (2) that is cleavable by MMP 9 to albumin after a 1-minute incubation with human plasma

The doxorubicin-maleinimide-peptide derivative (2) was produced according to the following reaction equation:



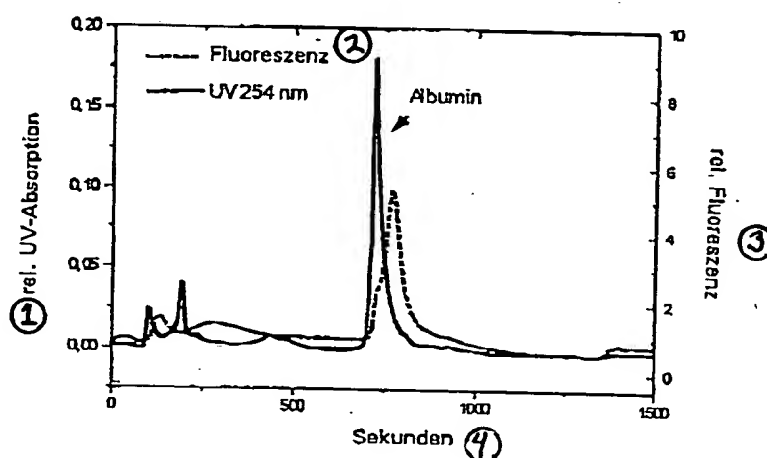
Key: 1 N-methylmorpholine

The octapeptide Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (Mr 848, prepared by means of solid-phase synthesis by the firm of Bachem AG, Switzerland) which was derivatized with maleinimidoglycine is reacted with doxorubicin according to the following specification:

25 mg of 1 (in the form a trifluoroacetate salt) dissolved in 500  $\mu$ L of DMF, 33.5 mg of O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HPTU) dissolved in 200  $\mu$ L of DMF, 11.9 mg of hydroxybenzotriazol hydrate dissolved in 100  $\mu$ L of DMF, and 16.2  $\mu$ L of N-methylmorpholine were added to a slightly cloudy solution of 17.1 mg of doxorubicin in 3 mL of DMF, and the solution was subsequently stirred for 18 h in the dark at RT. DMF was removed under a high vacuum, and the solid was taken up in 20 mL of methanol, filtered, and concentrated to 1 mL in vacuo. After purification with silica gel (acetic ester/methanol 2/1), 5 mg of 2 were obtained.

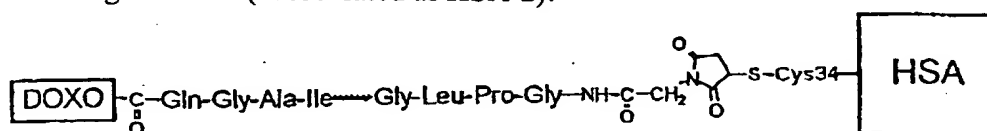
### Incubation study with human plasma

1.4 mg of 2 (Mr 1374) are dissolved at room temperature in 1.0 mL of phosphate buffer (0.15 M NaCl, 0.004 M sodium phosphate, pH 6.5) (1000  $\mu$ L solution). When 300  $\mu$ L of this solution are incubated with 1.0 mL of human plasma for 60 sec at 37°C and the sample is subsequently separated in a weak anion exchanger (from POROS®), it is seen that the major portion of 2 is bound to albumin (see the chromatogram below):



- Key: 1 Relative UV absorption  
 2 Fluorescence  
 3 Relative fluorescence  
 4 Seconds

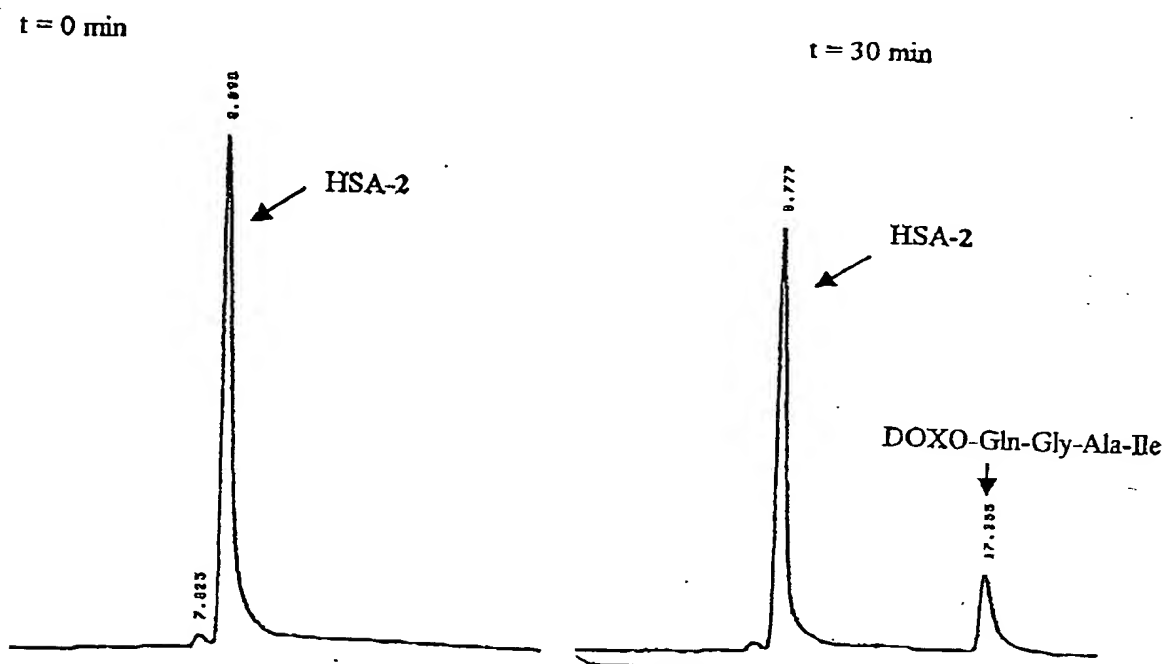
The peptide sequence Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly is recognized by the matrix metalloprotease MMP 9 and cleaved between isoleucine and glycine. This can be demonstrated by the following experiment: 200  $\mu$ L of a 100  $\mu$ M solution of the albumin conjugate of 2 with the following structure (abbreviated as HSA-2):



HSA = Human-Serum-Albumin

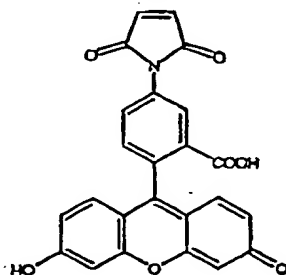
which had been prepared using the method described in the German Patent Application No. A19926475.9 of June 10, 1999, was incubated with trypsin/aprotinin-activated MMP 9 (2 mU

from Calbiochem, Germany) for 30 min at 37°C. The release of DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile after this period of time is shown in the chromatograms below. The chromatogram shown is the chromatogram of HSA-2 at  $t = 0$  (separation by means of HPLC exclusion chromatography with a Biosil 250 SEC column of the firm of Biorad, detection at  $\lambda = 495$  nm) and after an incubation time with activated MMP 9 of 30 min.



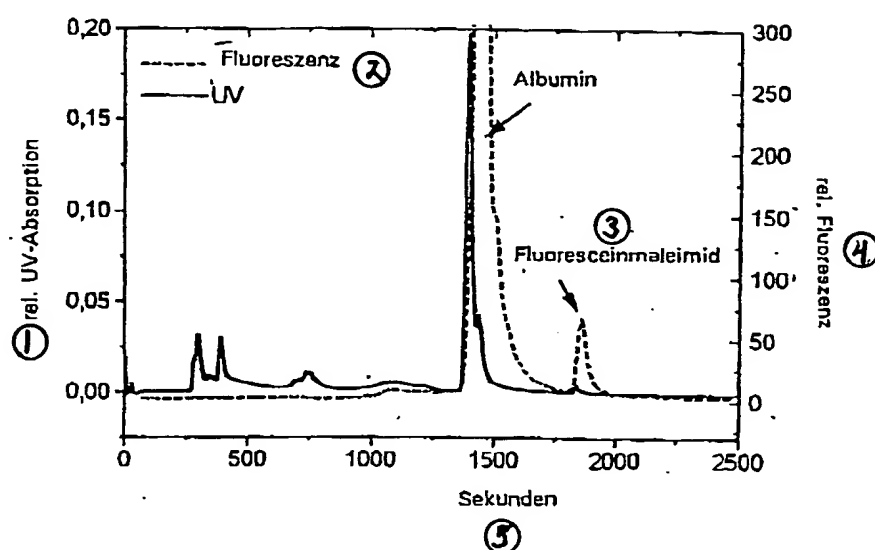
### Example 6

Binding fluorescein maleinimide [sic; maleimide] to albumin in human plasma



After a 5-minute incubation of 250  $\mu$ L of a 100  $\mu$ M fluorescein maleimide solution (phosphate buffer 0.15 M NaCl, 0.004 M sodium phosphate, pH 5.0) with 1.0 mL of human plasma and the subsequent separation of the sample by means of exclusion chromatography (Superdex® 200,

Pharamcia [sic; Pharmacia]), it can be seen that the major portion of the fluorescein maleimide is bound to albumin (see the chromatogram below):



- Key:
- 1 Relative UV absorption
  - 2 Fluorescence
  - 3 Fluorescein maleimide
  - 4 Relative fluorescence
  - 5 Seconds

### Claims

1. A method for the production of an injectable drug preparation containing a therapeutically and/or diagnostically active substance which is dissolved in an injectable carrier liquid, characterized by the fact that the therapeutically and/or diagnostically active substance used is a compound consisting of an active ingredient and a minimum of one protein-binding molecular residue which are connected by a spacer, with the spacer or the bond between the active ingredient and the spacer being pH-dependently, hydrolytically, or enzymatically cleavable in the body.

2. The method as claimed in Claim 1, characterized by the fact that the spacer or the bond between the active ingredient and the spacer is cleavable, thus releasing the active ingredient or a derivative of the active ingredient.

3. The method as claimed in Claim 1 or 2, characterized by the fact that the active ingredient is a cytostatic agent, a cytokine, an immunosuppressant, a virostatic agent, an antirheumatic agent, an analgesic, an antiphlogistic agent, an antibiotic, an antimycotic agent, a signal transduction inhibitor, an angiogenesis inhibitor, or a protease inhibitor.

4. The method as claimed in Claim 1, 2, or 3, characterized by the fact that the active ingredient is selected from the group of the anthracyclines, the nitrogen mustard derivatives, the alkylating agents, the purine or pyrimidine antagonists, the folic acid antagonists, the taxanes, the camptothecines, the podophyllotoxin derivatives, the vinca alkaloids, the calicheamicines, the maytansinoids, or the cis-configured platinum(II) complexes.

5. The method as claimed in any one of the preceding claim, characterized by the fact that the diagnostically active substance has one or several radionuclide(s), ligands comprising one or several radionuclide(s), one or several positron emitter(s), one or several NMR contrast agent(s), one or several fluorescent compound(s) and/or one or several contrast agents in the near IR range.

6. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized by the fact that the protein-binding molecule is a maleimide group, a haloacetamide group, a haloacetate group, a pyridyldithio group, an N-hydroxysuccinimide ester group, an isothiocyanate group, a disulfide group, a vinylcarbonyl group, an aziridine group, or an acetylene group which may optionally be substituted.

7. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized by the fact that the spacer is an organic molecular residue which contains an aliphatic carbon chain and/or an aliphatic carbon ring with 1-12 carbon atoms which can be partially substituted with oxygen atoms and/or a minimum of one aromatic hydrocarbon which may also be substituted.

8. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized by the fact that the bond between the active ingredient and the spacer or the protein-binding molecular residue contains a minimum of one peptide bond.

9. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized by the fact that in addition, a carrier molecule is used.

10. The method as claimed in Claim 9, characterized by the fact that bringing the carrier molecule into contact with the therapeutically and/or diagnostically active substance takes place *ex vivo*.

11. A therapeutically and/or diagnostically active substance with a content of a minimum of one active ingredient, characterized by the fact that this substance contains a minimum of one protein-binding molecular residue which is bound to the active ingredient by means of a spacer, with the spacer or the bond between the spacer and the active ingredient being pH-dependently,

hydrolytically or enzymatically cleavable in the body, with the active ingredient not being a cytostatic.

12. Diagnostically active substance with a content of a minimum of one diagnostic agent, characterized by the fact that the substance contains a minimum of one protein-binding molecular residue which is bound to the diagnostic agent by means of a spacer, with the spacer or the bond between the spacer and the diagnostic agent being pH-dependently, hydrolytically or enzymatically cleavable in the body.

13. The use of the therapeutically and/or diagnostically active substance according to one of Claims 1-10 in the treatment of cancer diseases, virus diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and diseases which are caused by bacteria, fungi or other microorganisms.

14. A diagnostic kit containing the protein-binding, diagnostically active substance according to any one of Claims 5-12, possibly a carrier molecule, and pharmaceutically compatible auxiliary agents, carrier substances and/or diluting agents.

15. The use of the diagnostically active substance as claimed in any one of Claims 5-10 and 12 or of the diagnostic kit as claimed in Claim 14 for the identification of cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms and/or for the detection of the carrier molecule and its distribution in the organism.

16. A method for the production of an injectable drug preparation containing a diagnostically active substance which is dissolved in an injectable carrier liquid, characterized by the fact that the diagnostically active substance used is a compound comprising a diagnostic agent and a minimum of one protein-binding molecular residue.

17. The method as claimed in Claim 16, characterized by the fact that the diagnostic agent and the protein-binding molecular residue is bound by means of a spacer.

18. The method as claimed in Claim 16 or 17, characterized by the fact that the bond between the diagnostic agent and the protein-binding molecular residue or the spacer is not cleavable.

19. The method as claimed in Claim 18, characterized by the fact that the diagnostic agent and the protein-binding molecular residue are bound to each other by means of an amide bond.